

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLI CHRESTANI

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE
GALACTOMANANAS SULFATADAS CONTRA O ROTAVÍRUS
SÍMIO SA-11.**

**Curitiba
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLI CHRESTANI

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE
GALACTOMANANAS SULFATADAS CONTRA O ROTAVÍRUS
SÍMIO SA-11.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica) Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Ono

**Curitiba
2009**

FRANCIELLI CHRESTANI

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE
GALACTOMANANAS SULFATADAS CONTRA O ROTAVÍRUS
SÍMIO SA-11.**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lucy Ono – Orientadora
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof. Dr. Marcos Pileggi
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética - UEPG

Dra. Paula Cristina de Sousa Faria Tischer
Laboratório de Biopolímeros – UFPR

Curitiba, 26 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e amigos espirituais que me acompanharam durante estes dois anos, fortalecendo e confortando o meu espírito diariamente para a realização deste trabalho.

À minha família, meu pai Carlos Alberto Chrestani, minha mãe Dirce Migdalski Chrestani, meus irmãos Carlos Geovanni Chrestani e Rafael Espedito Chrestani, e os membros da espécie *Canis familiaris* de raça indefinida, Horácio, Koda e Serafim, que sempre me ensinaram os verdadeiros valores da vida. Ao falar em valores, não poderia deixar de agradecer a presença de duas pessoas que não têm idéia do que seja mestrado e, no entanto foram meus grandes incentivadores, meus avós maternos Luiz Migdalski (*in memoriam*) e Lídia Migdalski.

Ao meu noivo, Milton Geraldo Wolinski Junior por todo o conforto, carinho, amor e compreensão depositados em nossa relação. Sua mãe, Dna Edda Wolinski pelos pães deliciosos que mandava para incrementar meu cardápio semanal.

Aos amigos que reencontrei, Tatiane Mariussi e Silva e Geovan Correa (companheiro de idas e vindas) e amigos que encontrei e jamais esquecerei: Emanuelle Gemin, Carla Elisabeth de Oliveira Ferreira, Taíssa Ricciardi Jorge, Adriana Bravos, Rosangela Rodrigues dos Santos, Cleverson Patussi, Lara Elize do Nascimento Cunha, Alessandra Ghellere.

Amigos do lab.: Manu, Carla, Ale, Tatá, Rô, Adri, Cleverson e Lara, só tenho a agradecer os momentos de trabalho ao lado de vocês, e claro, às risadas, bagunças e stress em busca de resultados que parecem nunca chegar.

Ao pessoal do Biopol, Neoli Lucyszyn, Cristiane Ribeiro, Francine Valenga, Clayton Fernandes de Souza, Tatiane Akemi Jo, Íris Marvila Oliveira, sempre muito prestativos com a mestrandia mais “perdida” do laboratório.

Ao Prof. Msc. Luiz Felipe Caron. Que pessoa fantástica! Adorava escutar suas conversas, me faziam refletir sobre a vida, e muito além dela.

Ao responsável por meu interesse em microbiologia, desde 2001, meu grande incentivador e professor, Dr. Marcos Pileggi, que apresentou para mim, pela primeira vez, o interessante mundo microbiológico.

À Profa. Dra. Lucy Ono que me orientou com muita paciência e dedicação, encorajando-me quando o plano A não estava correspondendo às expectativas e, apontando um plano B seguíamos em frente, fazendo com que cada resultado fosse importante.

Ao Prof. Dr. Carlos Mitihiko Nozawa, por ceder gentilmente as amostras virais que utilizamos neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski, Projeto CNPq -Nanoglicobiotechnologia, N° 55.5169/2005-7, pela concessão da bolsa DTI-1E.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Marcos Pileggi e Dra. Paula Cristina de Sousa Faria Tischer pelas correções e sugestões.

“Se, ao final desta existência,
Alguma ansiedade me restar
E conseguir me perturbar;
Se eu me debater aflito
No conflito, na discórdia...

Se ainda ocultar verdades
Para ocultar-me,
Para ofuscar-me com fantasias por mim criadas...

Se restar abatimento e revolta
Pelo que não consegui
Possuir, fazer, dizer e mesmo ser...

Se eu retiver um pouco mais
Do pouco que é necessário
E persistir indiferente ao grande pranto do mundo...
Se algum ressentimento,

Algum ferimento
Impedir-me do imenso alívio
Que é o irrestritamente perdoar,

E, mais ainda,
Se ainda não souber sinceramente orar
Por quem me agrediu e injustiçou...

Se continuar a mediocrementemente
Denunciar o cisco no olho do outro
Sem conseguir vencer a treva e a trave
Em meu próprio...

Se seguir protestando
Reclamando, contestando,
Exigindo que o mundo mude
Sem qualquer esforço para mudar eu...

Se, indigente da incondicional alegria interior,
Em queixas, ais e lamúrias,
Persistir e buscar consolo, conforto, simpatia
Para a minha ainda imperiosa angústia...

Se, ainda incapaz
para a beatitude das almas santas,
precisar dos prazeres medíocres que o mundo vende...

Se insistir ainda que o mundo silencie
Para que possa embeber-me de silêncio,
Sem saber realizá-lo em mim...

Se minha fortaleza e segurança
São ainda construídas com os materiais
Grosseiros e frágeis
Que o mundo empresta,
E eu neles ainda acredito...

Se, imprudente e cegamente,
Continuar desejando
Adquirir,
Multiplicar,
E reter
Valores, coisas, pessoas, posições, ideologias,
Na ânsia de ser feliz...

Se, ainda presa do grande embuste,
Insistir e persistir iludido
Com a importância que me dou...

Se, ao fim de meus dias,
Continuar
Sem escutar, sem entender, sem atender,
Sem realizar o Cristo, que,
Dentro de mim,
Eu Sou,
Terei me perdido na multidão abortada
Dos perdulários dos divinos talentos, Os talentos que a Vida
A todos confia,
E serei um fraco a mais,
Um traidor da própria vida,
Da Vida que investe em mim,
Que de mim espera
E que se vê frustrada
Diante de meu fim.

Se tudo isto acontecer
Terei parasitado a Vida
E inutilmente ocupado
O tempo
E o espaço
De Deus.
Terei meramente sido vencido
Pelo fim,
Sem ter atingido a Meta."

(Professor Hermógenes)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ROTAVÍRUS.....	3
1.1.1 Classificação.....	3
1.1.2 Partícula Viral.....	4
1.1.3 Patogenia.....	8
1.1.4 Imunologia.....	10
1.1.5 Vacina.....	11
1.1.6 Diagnóstico.....	13
1.1.7 Cultivo.....	14
1.1.8 Rotavírus e drogas antivirais.....	15
1.2 POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	17
1.3 GALACTOMANANAS.....	18
1.3.1 <i>Leucaena leucocephala</i> (Leucena) e <i>Mimosa scabrella</i> (Bracatinga).....	19
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 GERAIS.....	24
2.2 ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 CULTIVO CELULAR.....	25
3.2 MULTILICAÇÃO CELULAR.....	25
3.3 TITULAÇÃO DO ROTAVÍRUS SÍMIO (SA – 11).....	26

3.4 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS GALACTOMANANAS NATIVAS E SULFATADAS DE LEUCENA E BRACATINGA EM CÉLULAS MA ₁₀₄	27
3.5 TESTE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTOMANANAS NATIVAS E SULFATADAS DE LEUCENA E BRACATINGA CONTRA ROTAVIRUS SÍMIO SA – 11.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO ROTAVÍRUS SÍMIO SA – 11.....	30
4.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS GALACTOMANANAS NATIVAS E SULFATADAS DE LEUCENA E BRACATINGA EM CÉLULAS MA ₁₀₄	30
4.3 TESTE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DAS GALACTOMANANAS NATIVAS E SULFATADAS DE LEUCENA E BRACATINGA CONTRA O ROTAVIRUS SÍMIO SA – 11.....	40
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia eletrônica de partículas de rotavírus humano em amostra de fezes, partículas completas.....	1
Figura 2 - Distribuição dos tipos de rotavírus humano encontrados na América Latina.....	4
Figura 3 - Desenho esquemático da partícula de rotavírus localizando suas proteínas e material genético.....	7
Figura 4 - Esquema modificado da replicação do rotavírus	10
Figura 5 - Perfil eletroforético do genoma de rotavírus (RNA dupla fita).....	14
Figura 6 - Estrutura geral de galactomananas	19
Figura 7 - Fotografia mostrando folhas, folíolos e flores da leucena.....	21
Figura 8 - Fotografia do arbusto da bracatinga.....	23
Figura 9 - Fluxograma esquemático de multiplicação de rotavírus em linhagem celular MA ₁₀₄	26
Figura 10 - Fotografia de uma microplaca de 96 poços contendo DMSO em reação com cristais de formazam formando coloração roxa, lida em escala de absorbância no teste de citotoxicidade dos polissacarídeos.....	31
Figura 11 - Fotografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , controle negativo, no teste de citotoxicidade das galactomananas nativas de leucena e bracatinga. 72 horas de incubação.....	38

Figura 12 - Fotografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , no teste de citotoxicidade da galactomanana nativa de leucena em concentração de 156,3 µg/mL, 72 horas de incubação.....	38
Figura 13 - Fotografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , no teste de citotoxicidade da galactomanana sulfatada de leucena em concentração de 156,3 µg/mL, 72 horas de incubação.....	39
Figura 14 - Fotografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , no teste de citotoxicidade da galactomanana nativa de bracatinga em concentração de 156,3 µg/mL, 72 horas de incubação.....	39
Figura 15 - Fotografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , no teste de citotoxicidade da galactomanana sulfatada de bracatinga em concentração de 156,3 µg/mL, 72 horas de incubação.....	40
Figura 16 - Monocamada celular de MA ₁₀₄ , não infectada e sem polissacarídeo – controle negativo, 72 h de incubação.....	41
Figura 17 - Monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , ausência de polissacarídeo, controle positivo, 72 h de incubação.....	41
Figura 18 - Monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , galactomanana sulfatada de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação.....	42
Figura 19 - Monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , com galactomanana sulfatada de bracatinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação	42
Figura 20 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , ausência de polissacarídeo - controle positivo, 72h de incubação.....	43
Figura 21 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ , não infectada e sem polissacarídeo – controle negativo, 72 h de incubação.....	43
Figura 22 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , com galactomanana nativa de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação.....	44
Figura 23 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA ₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID ₅₀ , com galactomanana sulfatada de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação.....	44

Figura 24 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana nativa de bracatinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação.....45

Figura 25 - Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana sulfatada de bracatinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação sistemática de Engler da leucena citada por ONO (2004).....	20
Tabela 2 - Classificação sistemática de Engler da bracatinga citada por ONO (2004).....	22
Tabela 3 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da galactomanana nativa de leucena em células MA ₁₀₄ pelo método do MTT.....	34
Tabela 4 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da galactomanana sulfatada de leucena sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT.....	35
Tabela 5 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da galactomanana nativa de bracatinga sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT.....	36
Tabela 6 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da galactomanana sulfatada de bracatinga sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT.....	37
Tabela 7 - Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> da galactomanana nativa de leucena sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT – experimento durante e após adsorção (valores em porcentagem de células viáveis).....	48
Tabela 8 - Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> da galactomanana sulfatada de leucena sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT – experimento durante e após adsorção (valores em porcentagem de células viáveis).....	49
Tabela 9 - Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> da galactomanana nativa de bracatinga sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT – experimento durante a adsorção.....	50
Tabela 10 - Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> da galactomanana sulfatada de bracatinga sobre células MA ₁₀₄ pelo método do MTT – experimento durante a adsorção.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana nativa de <i>Leucaena leucocephala</i> em experimento de citotoxicidade - 72 horas de incubação.....	34
Gráfico 2 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana sulfatada de <i>Leucaena leucocephala</i> em experimento de citotoxicidade - 72 horas de incubação.....	35
Gráfico 3 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana nativa de <i>Mimosa scabrella</i> em experimento de citotoxicidade - 72 horas de incubação.....	36
Gráfico 4 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana sulfatada de <i>Mimosa scabrella</i> em experimento de citotoxicidade - 72 horas de incubação.....	37
Gráfico 5 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana nativa de <i>Leucaena leucocephala</i> em diferentes concentrações adicionadas durante e após adsorção viral.	48
Gráfico 6 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana sulfatada de <i>Leucaena leucocephala</i> em diferentes concentrações adicionadas durante e após adsorção viral.....	49
Gráfico 7 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana nativa de <i>Mimosa scabrella</i> em diferentes concentrações adicionadas durante e após adsorção viral.....	50
Gráfico 8 - Porcentagem de células MA ₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana sulfatada de <i>Mimosa scabrella</i> em diferentes concentrações adicionadas durante e após adsorção viral.....	51

LISTA DE SIGLAS

AS: Ácido Siálico
AZT: Azidotimidina
bLf: Lactoferrina Bovina
BN: Bracatinga Nativa
BS: Bracatinga Sulfatada
Ca⁺⁺: Íons Cálcio
CC50: Concentração Citotóxica 50%
DICT50: Dose Infectiva 50% em Cultivo Celular
DMEM: Meio DUBELCCO de cultivo celular
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EDTA: Ácido etilenodiaminico tetra-acético
EIARA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno de Rotavírus e Adenovírus
ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto
HCMV: Citomegalovírus Humano
HeLa: Linhagem celular de epitélio humano
HIV: Vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana
HSV: Vírus Herpes Simplex
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
Kb: Quilobase (unidade de medida de ácido nucleico)
KDa: QuiloDalton (unidade de medida)
LF: Lactoferrina
LN: Leucena Nativa

LS: Leucena Sulfatada
M.E: Microscópio Eletrônico
MA₁₀₄: Linhagem Celular de Rim de Macaco
MDDA: Monitoramento da Doença Diarréica Aguda
mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro
MTT: 3-(4'5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio
MuLV: Vírus da Leucemia Murina
nm: Nanômetro (unidade de medida 10⁻⁹)
NSPs: Proteínas não estruturais que formam a partícula do rotavírus
NTP: Nucleosídeo trifosfato
PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
RNA: Ácido Ribonucléico
RSV: Vírus Sincicial Respiratório.
RT-PCR: Reação da Cadeia em Polimerase com Transcriptase Reversa
RV: Rotavírus
SEAB – PR: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná
SFB: Soro Fetal Bovino
SNE: Sistema Nervoso Entérico
TPB: Caldo Triptose Fosfato
UEL: Universidades Estadual de Londrina
u.f.p.: Unidade Formadora de Placa
UFPR: Universidade Federal do Paraná
Vero: Linhagem celular de rim de macaco verde
VP: Proteínas estruturais que formam a partícula do rotavírus
WHO: World Health Organization
µm: Micrômetro (unidade de medida 10⁻⁶ m)

RESUMO

Rotavírus tem sido reconhecido há 30 anos por ser o maior causador de gastroenterites de origem viral em crianças. Em todo o mundo, a diarreia é a principal causa de morte em recém – nascidos, afetando não apenas humanos, mas jovens animais. A situação torna-se mais grave por não haver antivirais efetivos contra rotavírus. A atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *Leucaena leucocephala* (leucena) e *Mimosa scabrella* (bracatinga) foram testadas contra rotavírus sítio SA - 11 em cultivo *in vitro*, com adição durante a adsorção e permanecendo após a adsorção. Nenhum dos polissacarídeos testados reduziu o título viral. A galactomanana sulfatada de leucena apresentou efeito citotóxico nas concentrações de 625 - 156 µg/mL, reduzindo as células viáveis em 77,34%, 75,64%, e 35,27%, com CC50 ~ 255 µg/mL. As demais amostras não apresentaram concentração citotóxica nas concentrações testadas, com CC50 > 625 µg/mL. Com o teste do MTT, células infectadas, contendo polissacarídeos sulfatados de bracatinga [0,6 – 156,2 µg/mL] apresentaram até 13,5% a mais de células viáveis em relação ao controle positivo. Não houve redução do título viral em nenhuma das amostras. Testes posteriores de avaliação da atividade antiviral *in vivo* contra rotavírus serão necessários.

ABSTRACT

Rotavirus has been recognized for 30 years as the most common cause of viral gastroenteritis in infants and young children. Diarrhoea is one of the major causes of death, mainly in newborn worldwide. There is no effective antiviral drug against rotavirus infections that makes worse the situation. The antiviral activity of the native and sulfated galactomannans of *Leucaena leucocephala* (leucena) and *Mimosa scabrella* (bracatinga) was carried out against simian rotavirus SÁ - 11 *in vitro*, through addition during and after the viral adsorption period. None of the tested polysaccharides reduced the viral title. The sulfated galactomannan of leucena tree presented toxicity at the range of concentrations of 625 - 156 µg/mL, reducing the viable cells in 77.3%, 75.6%, and 35.3%, respectively, with CC50 ~ 255 µg/mL. The other samples didn't present cytotoxicity up to 625 µg/mL (CC50 > 625 µg/mL). Applying the MTT test, the infected cells, containing sulfated polysaccharide of bracatinga tree [0,6 – 156,2 µg/mL] presented up to 13,5% viable cells in relation to the positive control. There was no reduction of the viral title in none of the samples. Further *in vivo* antiviral activity tests against rotavirus will be necessary.

1. Introdução

Vírus são microrganismos que apresentam características próprias, o que os fazem únicos. São partículas microscópicas capazes de comandar sua própria replicação desde que estejam no interior de uma célula viva. Os vírus foram caracterizados por passar através de filtro de membrana usado para reter bactérias. De modo geral, estas partículas apresentam ácido nucléico (DNA e/ou RNA) envolvido por camada protéica, e, no entanto, são partículas complexas. Por não apresentarem metabolismo, utilizam a maquinaria celular para se replicarem (CONDIT, 2001).

Infecções gastrointestinais causadas por rotavírus são denominadas rotaviroses. Os rotavírus foram primeiramente descritos por Mebus e sua equipe em 1969 como um dos principais agentes etiológicos da diarreia em gado jovem (2 a 4 semanas de vida), e desde então, têm sido identificado como causador de gastroenterites em animais e humanos em todo o mundo (BABIUK *et al.*, 1977). As partículas visualizadas em microscópio eletrônico (M.E) a partir de uma amostra de mucosa duodenal de crianças com gastroenterite foi denominada rotavírus, palavra derivanda do latim, onde rota significa roda, por causa da semelhança morfológica das partículas virais com rodas de carroça (FIGURA 1) (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK , 2001; ANDERSON, WEBER, 2004).

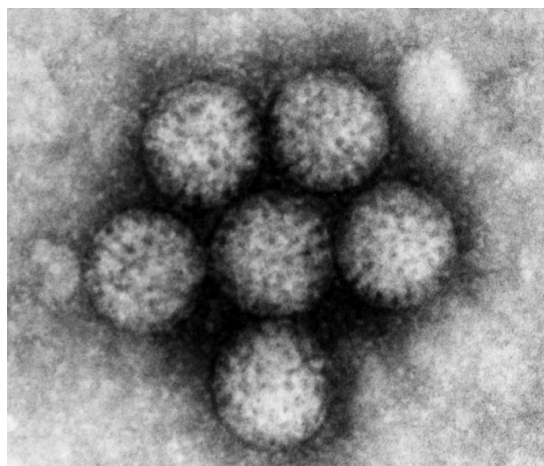


Figura 1: Fotomicrografia eletrônica de partículas de rotavírus humano em amostra de fezes, partículas virais completa.
Fonte: (http://www.liv.ac.uk/vets_med_images/mmgum/rotavirus.jpg - último acesso, em fevereiro de 2009).

A rotavirose em animais de abate (gado e suíno) tem grande impacto econômico, com alta morbidade e mortalidade (RAMOS, 1998; JUNG, 2008), representando prejuízo de 3,1 – 8,7 milhões de dólares por ano em todo o mundo (JEREZ *et al.*, 2002).

Em humanos, os rotavírus infectam principalmente crianças em todo o mundo, estimando-se que os casos mais graves ocorram até 2 anos de idade e que até os 5 anos, aproximadamente 90% das crianças sejam infectadas. Em países em desenvolvimento, a rotavirose é responsável por levar a óbito 5% (1 a cada 25) das crianças com até 5 anos de idade, e por 22 – 60% das hospitalizações infantis. (GLASS *et al.*, 2005; ANDERSON, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2008). Na América Latina, os rotavírus são responsáveis por 15.000 mortes e 75.000 hospitalizações por ano, representando 50% das hospitalizações por gastroenterites (PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

Em países de clima temperado a incidência de infecções se dá em épocas frias, já em países de clima subtropical e tropical, como o Brasil, ocorre durante o ano todo. Além do clima, aglomerados urbanos, alta densidade populacional, convivência com crianças, ambientes fechados, falta de higiene e saneamento básico contribuem para que haja surtos de infecção com a rápida disseminação do vírus (MEHNERT *et al.*, 1997; GLASS *et al.*, 2005).

De acordo com o datasus, em 2003 ocorreram 269.195 casos de internamento por diarreia de diversas origens em crianças menores de cinco anos no Brasil. Os surtos de rotavírus têm sido freqüentemente detectados pelo programa de Monitoramento da Doença Diarréica Aguda (MDDA). Este sistema detecta o aumento de surtos por rotavírus ao longo do tempo. Em 1999, 7,7% dos casos de gastroenterites foram causados por rotavírus; em 2004, foram registrados em mais de 20% dos surtos (VRANJAC, 2006).

O modo de transmissão ocorre pela via fecal-oral por meio de água e alimentos contaminados, contato pessoa–pessoa e fômites, sendo que a maioria das partículas virais é excretada pelas fezes (até um trilhão de partículas por mililitro de fezes), além de secreções respiratórias. Os surtos são de difícil controle, uma vez que para estabelecer a infecção é necessária a ingestão de poucas partículas virais, cerca de 10-100 partículas infecciosas. Este número é significativo uma vez que as partículas virais podem sobreviver por dias nas fezes contaminadas em temperatura ambiente (SESSP, 2006; PAREZ; 2008).

1.1 Rotavírus

1.1.1 Classificação

O gênero Rotavirus pertence à família *Reoviridae*, dentro da qual os rotavírus são classificados em sete grupos (ou sorogrupos: A, B, C, D, E, F, G) e o grupo A é subdividido em 5 subgrupos (I, II, I e II, não I e não II), de acordo com determinantes antigênicos presentes na proteína VP6 (FRANCO, ANGEL, GREENBERG, 2006).

A análise das sequências dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 também é usada para identificar estes genes dentro de diferentes grupos. Em um total de 15 genótipos G descritos, 10 estão associados com infecções em humanos. Genótipos G são determinados por análises das seqüências de VP7. A análise dos genes VP4 fornecem os dados de 24 diferentes genótipos P, mas somente 13 estão relacionados a sorótipos. As proteínas VP7 e VP4 podem ser combinadas para originar até 80 combinações teóricas capazes de promover infecção no homem (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK, 2001; VILLEGAS *et al.*, 2002; PEREZ-VARGAS *et al.*, 2006; SESSP, 2006).

Um fator que deve ter contribuído para a diversidade sorotípica existente é o genoma segmentado apresentado pelo vírus, contribuindo para a recombinação dos genes das proteínas VP4 e VP7. Assim, uma mesma célula infectada com duas ou mais linhagens pode gerar uma variedade de combinações P/G diferente das linhagens originais (FRANCO, ANGEL, GREENBERG, 2006; PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

Genótipos comumente encontrados em rotavírus animais têm sido encontrados também em infecções em seres humanos, embora não seja comum. Novas técnicas de biologia molecular estão sendo utilizadas para a caracterização de genótipo e sorótipo de rotavírus, importante para obtenção de novos dados de epidemiologia (GOMARA *et al.*, 2001; ESPÍNOLA *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos mostram que:

- Diferentes sorótipos G e P podem circular em uma mesma região;
- Existe prevalência de sorótipos específicos em determinadas regiões;

Os tipos mais comuns de rotavírus isolados na América Latina são G1P[8] (40%), G2P[4] (30%), G3P[8] (6%) e G4P[8] (7%). Linhagens G9 são amplamente distribuídas, enquanto que G5 são comuns somente em algumas regiões (FIGURA 2). Nesse mesmo levantamento realizado por PÉREZ-VARGAS *et al.* (2006), 20% das amostras isoladas não foram tipadas e 12% das amostras contiveram mais do que uma linhagem viral.

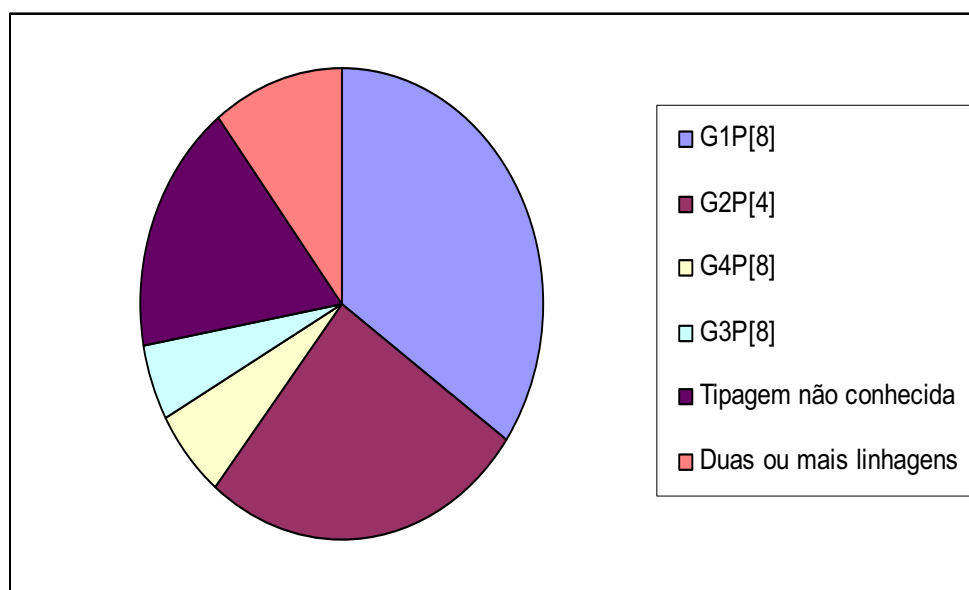


Figura 2: Distribuição dos tipos de rotavírus humano encontrados na América Latina Fonte: PÉREZ-VARGAS (2006).

1.1.2 Partícula viral

Os rotavírus (RV) apresentam aproximadamente 70 nm de diâmetro (1000 Å), capsídeo com simetria icosaédrica formado por tripla camada protéica, são desprovidos de envelope viral, têm genoma composto por 11 segmentos de RNA fita dupla e enzimas que atuam na síntese de RNA mensageiro e genoma viral (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK, 2001; PAREZ, 2008).

Nos RV estão presentes 12 proteínas virais, sendo seis estruturais (VP) e seis não-estruturais (NSPs). O capsídeo é composto por três camadas concêntricas de proteínas estruturais que envolvem as proteínas não-estruturais e o RNA viral. Partículas completas e infecciosas devem apresentar as três camadas protéicas

(FIGURA 3), sendo que a camada mais externa é formada pelas proteínas denominadas VP4 e VP7, a camada intermediária por VP6 e a camada interna, formada por VP1, VP2 e VP3 (VILLEGAS *et al.*, 2002; STEFANELLI *et al.*, 2002).

VP1 é uma RNA polimerase dependente de RNA, e VP3 uma guanilil metil transferase. VP1 e VP3 estão presentes em pequenas quantidades, porém apresentam funções enzimáticas necessárias para transcrição do genoma viral. VP2 é a proteína mais abundante dentre as três que compõe o capsídeo interno, tem capacidade de se auto-arranjar, é formada por 120 moléculas organizadas em 60 dímeros que no arranjo final apresentam formato icosaédrico, o que é uma característica conservada para os membros da família *Reoviridae* e de outros vírus de RNA fita dupla. É a única proteína do capsídeo interno que interage com VP6 (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK, 2001; JAYARAN, ESTES, PRASAD, 2004).

A camada externa é formada por 780 cópias da glicoproteína VP7 (38 KDa) e 120 cópias de VP4 (88KDa). A Proteína VP4 é a responsável pela diferenciação dos rotavírus em genotipos e sorotipos “P”, apresentando 60 pequenas espículas de 10 – 12 nm de comprimento que se projetam para a superfície viral, não é glicosilada e representa 1,5% das proteínas virais; não está apenas envolvida na penetração do vírus à célula hospedeira, mas também apresenta capacidade de hemaglutinação (rotavírus humanos não apresentam essa propriedade) e está relacionada à virulência viral. Uma das características que torna a VP4 uma das enzimas rotavirais mais estudadas é o fato de ela ser sensível à proteólise, e essa clivagem proteolítica promove aumento da infectividade do rotavírus, facilitando a sua internalização na célula hospedeira. Durante a proteólise, seja por tripsina, elastase ou pancreatina, a VP4 (88 kDa) é clivada em VP8 (28 kDa) e VP5 (60 kDa), que passam a apresentar maior caráter lipofílico, logo, partículas virais tripsinizadas na luz do trato intestinal penetram nas células hospedeiras mais rapidamente em relação às partículas virais não tripsinizadas (ESTES, GRAHAM, MASON, 1981; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK, 2001; SESSP, 2006).

VP7 é uma glicoproteína de genotipo e de sorotipo denominado “G” que corresponde a 30% do vírion, apresentando 780 cópias e parece estar associada à membrana plasmática ou ao retículo endoplasmático, sinalizando a montagem e liberação das partículas virais recém-formadas em associação com VP4. Sugere-se que pode modular a ação de VP4 como sinalizador para penetração do vírus na célula. Alguns anticorpos anti-VP7 neutralizam o vírus, inibindo sua desnudamento

no interior celular, o que impede a replicação viral. A integridade da estrutura de VP7 é dependente de níveis adequados de cálcio (Ca^{++}). No interior citoplasmático onde os níveis de Ca^{++} são baixos, ocorre a dissociação desta proteína, e consequentemente do capsídeo externo. A análise das sequências dos genes que codificam VP4 e VP7 também são usadas para classificar estes genes dentro de diferentes grupos (LIPRANDI *et al.*, 1997; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004; PÉREZ – VARGAS *et al.*, 2006).

A segunda camada viral, a camada intermediária, é formada pela proteína estrutural VP6. A VP6, de 41 KDa, é formada por 260 trómeros altamente estáveis, fazendo parte de 51% do vírion e a maior proteína estrutural encontrada nos RV, e, embora não tenha função enzimática, parece ter papel na entrada do vírus na célula e na transcrição endógena, pois interage com VP4 e VP7 do capsídeo externo, e VP2 do interno por meio de interações predominantemente hidrofóbicas. As ligações triméricas de VP6 formam-se espontaneamente, e a estabilidade dessas ligações sugere a preservação de seus epítomos, e por isso, é o antígeno mais utilizado em diagnósticos imunológicos para RV. VP6 é o principal antígeno para o diagnóstico de rotavirose (GOÉS *et al.*, 2008).

As proteínas estruturais VP4, VP6 e VP7 estão sendo extensivamente estudadas por suas propriedades antigênicas, seu papel na replicação viral e montagem das partículas virais (ARIAS *et al.*, 2004).

Além das proteínas estruturais, a partícula viral apresenta proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. Todas, exceto NSP4, estão envolvidas na replicação viral. A NSP3, de 63 KDa, auxilia a tradução do RNA viral, reduzindo a síntese de proteínas celulares à medida que potencializa a síntese protéica viral, protegendo o RNA viral da ação de nucleases presentes no citoplasma celular (PIRON *et al.*, 1998; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004).

A NSP2 apresenta estrutura octamérica e está envolvida na replicação do genoma e montagem viral, utilizando energia da hidrólise de NTP, para desempenhar função de nucleotídeo transferase. Esta enzima fica localizada no interior de viroplasmas, inclusões citoplasmáticas nas quais ocorrem os eventos de replicação viral. A NSP4 é uma glicoproteína conhecida por ser a primeira enterotoxina viral descrita, interage com receptores de membrana do enterócitos até então não identificado. Esta proteína imobiliza o tráfego de vesículas celulares do retículo endoplasmático (R.E) para o complexo de Golgi (C.G), direcionando a

maquinaria celular para complementar as atividades de replicação viral (ESTES 2001; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004; ARIAS *et al.*, 2004; CHOI, ESTES, LANGRIDGE, 2005).

O genoma viral RNA dupla fita está na forma de 11 segmentos, envoltos por tripla camada protéica, medindo entre 0,6 – 3,3Kb. Após o desnudamento viral, devido a baixos níveis de Ca^{++} citoplasmático, permanecem ainda as camadas protéicas intermediária e interna, formada por proteínas que auxiliam nos eventos de transcrição, transdução, e replicação viral. Após a transcrição, os transcritos são liberados dando início aos estágios de replicação viral: tradução e síntese protéica viral, replicação, onde o genoma é empacotado pelo agregado protéico que formam capsídeos interno e intermediário, e a Ligação desta partícula com VP4 e VP7, as proteínas do capsídeo externo, ocorrendo no retículo endoplasmático. Todos os segmentos genômicos são transcritos simultaneamente. De modo geral, vírus RNA dupla fita não apresentam seu genoma livre no citoplasma celular, mas sim associados a proteínas virais, fato que confere proteção do material genético viral contra nucleases citoplasmáticas que reconhecem esse tipo de estrutura (COHEN, 2001; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOK, 2001; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004; PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006; ESPÍNOLA *et al.*, 2008).

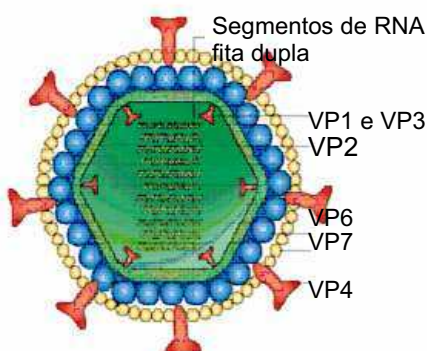


Figura 3: Desenho esquemático da partícula de rotavírus localizando suas proteínas e material genético (figura modificada de Nature Reviews / microbiology).
Fonte: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/abs/nrmicro1692.html>

1.1.3 Patogenia

Os episódios de diarreia causados por rotavírus variam de quadros leves, com fezes líquidas com duração limitada, a quadros agudos, com febre, náuseas, vômito, perda de apetite, dor abdominal e desidratação grave (PAREZ, 2008), com vômito após 2 – 3 dias de infecção, e diarreia entre o 4º e 5º dias (ANDERSON, WEBER, 2004). A infecção inicia-se pela ingestão de partículas virais viáveis, seguido de penetração nas células do epitélio do intestino delgado, enterócitos maduros, fato que desencadeia a diarreia característica do quadro clínico. A porta de entrada do vírus é a mucosa intestinal e é também o local onde se desenvolve a patologia (OFFIT, 1998; LUNDGREN, SVENSSON, 2001; MUTWIRI *et al.*, 2002).

Ligações entre RV e células hospedeiras ocorrem por meio de múltiplos processos. Os RV ácido siálico (AS) - dependentes utilizam resíduos de AS da superfície das células hospedeiras para iniciar o processo de internalização, penetrando no interior da célula através da superfície apical. Os resíduos de AS podem estar ligados a glicolípídeos ou glicoproteínas de superfície de membrana dos enterócitos. Linhagens AS - independentes podem penetrar na célula através das superfícies apical ou basolaterais, fator que facilita a infecção viral. A maioria dos RV que causam infecção em animais e humanos é AS - independente (BOSHUIZEN *et al.*, 2005).

Hipóteses foram propostas para como os RV entram nas células, como sendo por penetração direta, por fusão com o citoplasma, ou através de endocitose Ca^{++} -dependente, com o vírus endocitado pela célula quando a concentração de Ca^{++} citoplasmático é reduzida (ESTES, 2001; LUNDGREN, SVENSSON, 2001).

A diarreia decorrente da infecção por RV tem origem multifatorial, e todos os mecanismos que a induzem não são completamente conhecidos. Estudos mostram a ocorrência de alterações como: que a destruição dos enterócitos maduros, a atrofia das vilosidades intestinais, com a redução da absorção de água e nutrientes, a hipertrofia de células intestinais secretoras, e a estimulação do sistema nervoso entérico pela enterotoxina viral NSP4 que também induz a secreção de íons cloro promovendo a perda osmótica de água, são fatores que atuam no desenvolvimento do quadro clínico.

Durante a montagem de novas partículas virais, as alterações na concentração de cálcio citoplasmático, redução de síntese protéica celular e comprometimento do transporte de sódio na membrana citoplasmática também podem causar necrose do epitélio do intestino delgado, ocasionando má absorção de água e nutrientes, característica da diarreia (ANDERSON, WEBER, 2004).

Após a replicação citoplasmática do rotavírus em enterócitos maduros, a lise celular permite a liberação das novas partículas virais, podendo infectar outros enterócitos ou ser excretadas pelas fezes (ANDERSON, WEBER, 2004; BOSHUIZEN *et al.*, 2005; PEREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

Além do mecanismo de lise celular, as partículas virais podem ser liberadas por meio de transporte vesícula, partindo do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, e deste até a membrana plasmática apical. A proteína não-estrutural NSP4 imobiliza o tráfego de vesículas celulares do retículo endoplasmático (R.E) para o complexo de Golgi (C.G), modulando a atividade celular em função da replicação viral (FIGURA 4). As proteínas estruturais VP4 e VP7 podem ser detectadas em filamentos ordenados e VP4 está associado a microtúbulos facilitando a liberação das novas partículas virais para a luz intestinal (ESTES, 2001).

Geralmente a infecção por rotavírus em crianças está restrita aos enterócitos do epitélio do intestino delgado, nas vilosidades intestinais. Contudo modelos em animais, demonstrou-se que infecções por rotavírus podem não ser limitadas ao trato gastrointestinal; evidências recentes sugerem dois casos de óbitos de crianças por viremia, a sorologia dos dois casos foi positiva para rotavírus, e amostras do RNA viral foi encontrado em regiões extra-intestinais. Há hipóteses de que partículas virais e/ou antígenos estão migrando para o sistema circulatório, porém, não está determinada a relação entre viremia com diarreia causada por rotavírus (PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

Considerando o local da infecção, há grande interesse no desenvolvimento de vacinas orais que estimulem o sistema linfático de mucosa intestinal, porta de entrada do rotavírus (DUNCAN *et al.* 1996).

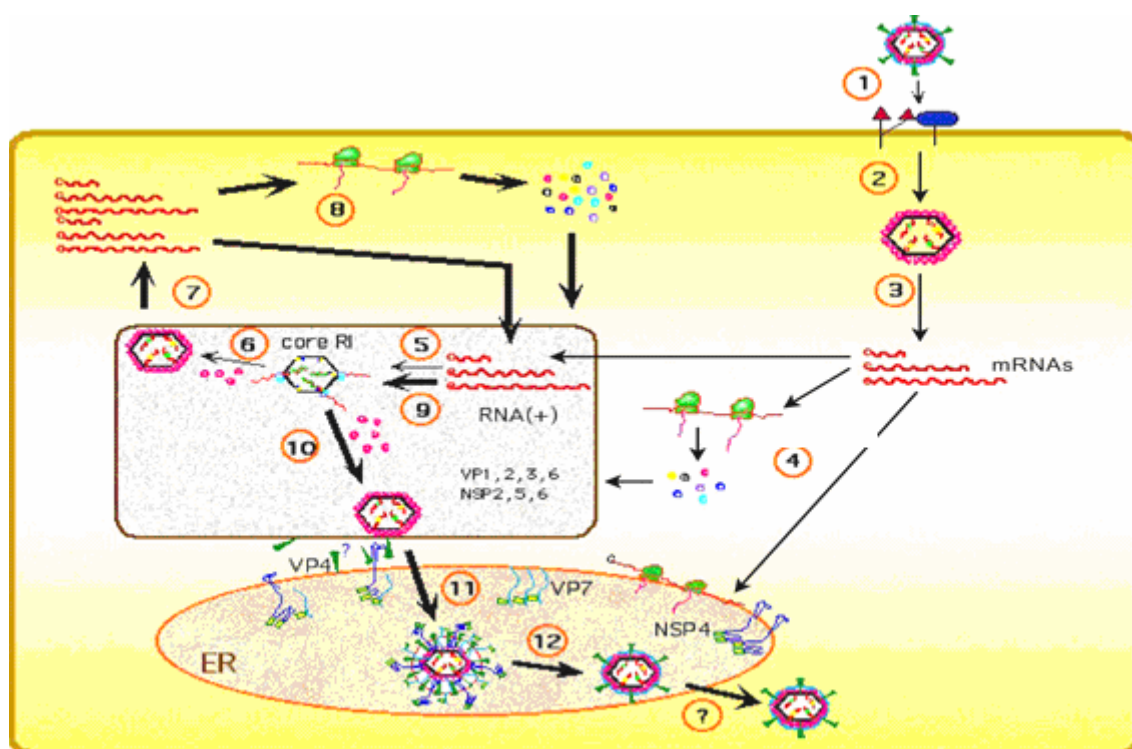


Figura 4: Esquema modificado da replicação do rotavírus. (1) adsorção, (2) penetração, (3) transcrição, (4) transdução (síntese proteica), (5) formação do core com a fita simples de RNA negativa; (6) montagem da camada intermediária do capsídeo; (7) síntese do RNA de dupla fita; (8) síntese de proteína viral; (9) montagem do core (segunda); (10) formação da dupla camada proteica (segunda); (11) penetra no R.E, ficando temporariamente com a tripla camada proteica (capsídeo viral), além de um envelope temporário, (12) que é removido, gerando a partícula viral madura – (?) mecanismo ainda não conhecido.
Fonte: ARIAS (2004).

1.1.4 Imunologia

Os fatores imunológicos que atuam na proteção contra reinfecções por RV não estão bem esclarecidos, no entanto, sabe-se da importância dos linfócitos T e B neste processo. Casos severos da doença ocorrem geralmente em infecção primária, sugerindo que há resposta adaptativa contra RV desenvolvendo-se gradualmente. Além das proteínas externas VP4 e VP7 determinarem a sorotipagem viral, elas induzem anticorpos neutralizantes. A proteína estrutural VP6, presente no capsídeo intermediário, tem papel importante no desenvolvimento de imunidade heterotípica, característica altamente conservada entre rotavírus do sorogrupo A (PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

Anticorpos maternos anti-rotavírus específicos (IgG e IgA) são naturalmente adquiridos durante a gestação e/ou lactação, conferindo proteção contra rotavirose em crianças e animais neonatos (JOHANSSON *et al.*, 2008).

A involução do quadro de gastroenterite causada por rotavírus depende de uma eficiente resposta imunológica do hospedeiro. Em um paciente imunocompetente, antígenos do rotavírus são transportados para as Placas de Peyer (sistema imune de mucosa intestinal) onde são processados pelas células B e macrófagos ou células dendríticas, ativando a resposta imune de mucosa, e são apresentados ao linfócito T auxiliar (helper). Uma série de ativações resultam em estimulação de células B e proliferação de linfócito T citotóxico rotavírus–específicos. Estudos sugerem que imunoglobulinas IgA são os principais anticorpos produzidos pelo hospedeiro durante a infecção por rotavírus, porém, frequentemente não é detectável nas fezes durante a primeira semana de infecção (LUNDGREN, SVENSSON, 2001; ANDERSON, WEBER, 2004; DESSELBERGER, GRAY, 2005).

Embora saiba-se que a infecção por rotavírus confira imunidade para toda a vida do indivíduo, há casos de reinfecção. Isso ocorre pelo amplo espectro de grupos, subgrupos e sorotipos de rotavírus. Neonatos infectados não estão protegidos contra a re–infecção até os três anos de vida, porém apresentam quadro clínico menos severo em relação à infecção primária (ANDERSON, 2004; ZOMER, 2008). Estudos em ratos mostram que anticorpos são cruciais para a proteção contra re-infecção de RV, enquanto células T CD8+ conferem a proteção em infecções primárias (FROMANTIN *et al.*, 1998; PÉREZ-VARGAS *et al.*, 2006).

1.1.5 Vacina

As primeiras vacinas contra rotavírus foram desenvolvidas na década de 80, eram de origem bovina e símia, mas não ofereciam proteção contra os sorotipos epidemiológicos mais importantes (VRANJAC, 2006).

Em 1998, nos Estados Unidos foi lançada a primeira vacina de segunda geração contra rotavírus – Rotashield[®], composta de vírus atenuados, a vacina era tetravalente, com um arranjo símio e humano. Foi desenvolvida a partir de cultura infectada com rotavirus símio, genotipo G3, juntamente com linhagens de rotavírus humano G1, G2 e G4 (PLOTKIN, 1999; JACOBSON *et al.*, 2001;

BONHOEFFER, HEATH, 2006). A administração da vacina era via oral aplicada em três doses, com 2, 4 e 6 meses de idade. Em 1999, a licença desta vacina foi cancelada pelo surgimento de casos de intussuscepção intestinal (invaginação de uma porção do intestino para dentro de outra, resultando em redução do suprimento sanguíneo ao segmento intestinal envolvido que pode levar a um sangramento significativo, perfuração e infecção) em algumas crianças vacinadas (uma a cada 32.000) (MIDTHUN, KAPIKIAN, 1996; CLARK; OFFIT, 1998; GLASS *et al.*, 2005; BINES, 2006).

No ano de 2001, a Aliança Global de Vacinas e Imunização (*Global Alliance for Vaccines and Immunization*) ofereceu incentivo às instituições de pesquisa ao desenvolvimento e inclusão de vacinas contra o rotavírus para crianças de países em desenvolvimento. A iniciativa foi apoiada pelos grupos: *World Health Organization* – WHO, *Institute of Medicine*, e *Children's Vaccine Initiative*. Algumas considerações foram feitas para a pesquisa e desenvolvimento da vacina, como o conhecimento do impacto na saúde pública em casos de surto por rotavírus, a estabilidade da vacina, e a compreensão de que vacinas efetivas podem levar de 5 a 10 anos para seu desenvolvimento (GLASS, *et al.*, 2005).

De maneira geral, vacinas orais são preferenciais por serem menos invasivas, porém, a produção de vacinas orais contra rotavírus encontra dificuldades em preservar a integridade do antígeno durante o percurso gastrointestinal devido à sensibilidade dos antígenos a baixos valores de pH, comuns no estômago, onde o ácido gástrico encontra-se em pH 3,0; proteínas imunogênicas perdem esse potencial com pH 3,5. Foi proposto que estas partículas virais deveriam ser encapsuladas em polímeros orgânicos resistentes a baixos valores de pH e se desintegrariam quando em contato com pHs básicos, como encontrado na porção inicial do intestino delgado, local de interesse para induzir resposta imune local contra rotavírus (DUNCAN *et al.*, 1996; MUTWIRI, 2002).

Atualmente existem duas vacinas licenciadas contra RV que estão sendo utilizadas em alguns países. A vacina oral, pentavalente de vírus atenuado humano – bovino (WC3) recombinante (G1, G2, G3, G4 e P1A[8]) desenvolvida pela Merck (Rotateq®), e a vacina monovalente de RV humano atenuado (G1P1A[8]), desenvolvido em 2000 na Finlândia por “Avant Immunotherapeutics”, e licenciado por GSK (Glaxo Smith Kline), Rotarix®, Belgium. No Brasil, a Rotarix® foi incluída no calendário nacional de imunizações do sistema único de saúde (SUS), a partir de

março de 2006 por apresentar alta imunogenicidade, eficácia e segurança (SESSP, 2006; DOMINGUES, *et al.*, 2008; GOÉS, *et al.*, 2008).

1.1.6 Diagnóstico

As técnicas de rotina para diagnósticos de rotavírus são ELISA (Imunoensaio enzimático), microscopia eletrônica (M.E), microscopia de imunofluorescência, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), formando quatro agregados de migração característicos, e RT-PCR (reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa). Em caso de suspeita de rotavirose estas técnicas são sensíveis mesmo com baixas concentrações de partículas virais nas fezes (JEREZ *et al.*, 2002; BARMAN *et al.*, 2006). Como pode ser observado na FIGURA 5, a eletroforese dos diferentes segmentos de RNA que compõem o genoma dos rotavírus permite, por meio da análise do perfil de migração eletroforético, pela técnica de PAGE, a identificação dos mesmos em grupos. Uma outra metodologia para detectar rotavírus em fezes é por Pathfinder™, pelo sistema de detecção direta de antígeno (Kallestad Diagnostics, Austin, TX, USA) (BERICIARTU, BOK, GÓMEZ, 2002). Aglutinação de microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos antígeno-específico, como o kit de diagnóstico em fezes para rotavirose muito utilizado no Brasil desenvolvido em 1985 pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) (PERET *et al.*, 1995; GÓES *et al.*, 2008).

GÓES (2008) realizaram testes de aglutinação em látex para avaliar sua sensibilidade e especificidade contra rotavirus do grupo A utilizando anticorpos para VP6, correspondendo a resultado satisfatório em 98,5% das amostras.

Acredita-se que devido aos problemas encontrados na replicação viral em cultura celular, o diagnóstico e caracterização do rotavírus deva ser feito diretamente a partir de amostras fecais, as quais devem ser adequadamente processadas para a confiabilidade do resultado (BABIUK *et al.*, 1977).

Para detectar poucas partículas de rotavírus, a técnica de RT-PCR em tempo real está sendo avaliada. Esta técnica se mostra sensível e específica, detectando até 1000 partículas virais em 100 mL de água. (GUTIÉRREZ – AGUIRRE *et al.*, 2008; JOTHIKUMAR *et al.*, 2009).

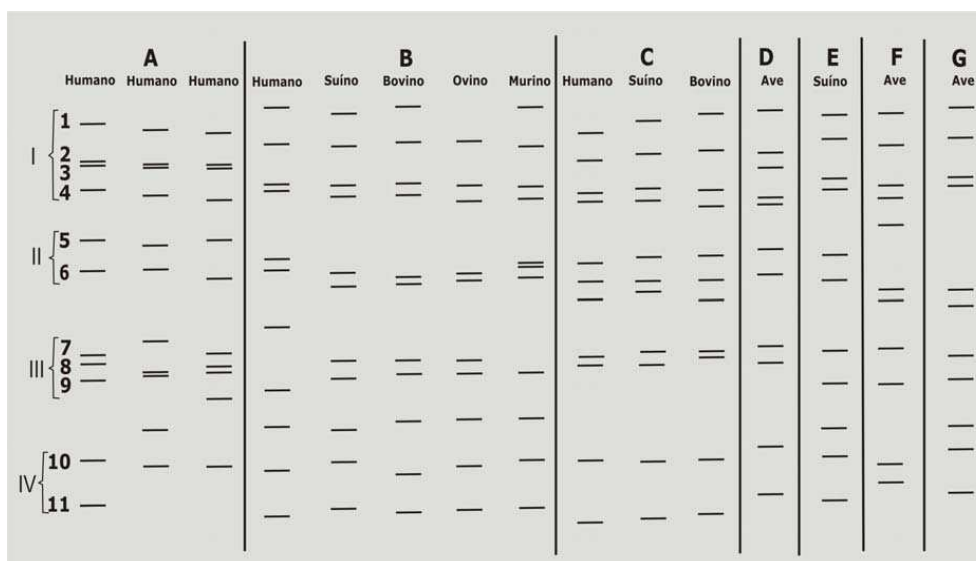


Figura 5: Perfil eletroforético do genoma de rotavírus (RNA dupla fita). (I) segmentos VP1, VP2, VP3 e VP4; (II) NSP1 e NSP2; (III) VP7, NSP2 e NSP3; (IV) NSP4, NSP5 e NSP6.

Fonte: MASCARENHAS, 2006.

1.1.7 Cultivo

O cultivo *in vitro* de rotavírus é realizado principalmente pela infecção da linhagem celular MA₁₀₄ (célula de rim de macaco), em meio de cultivo celular suplementado com tripsina cristalina pancreática, que potencializa a infecção (DELMAS *et al.*, 2004).

Em 1980 foi observado que para a linhagem Wa de rotavírus humano replicar eficientemente em cultivo celular, eram necessárias 11 passagens do vírus em leitões recém-nascidos até a adaptação *in vitro*. Com a adaptação foi possível o aumento do título viral apenas com o cultivo celular *in vitro* (KUTSUZAWA *et al.*, 1982).

Para a efetiva replicação viral em cultivo *in vitro* é necessária a presença de tripsina, para ativar as partículas virais. Trabalhos relatam diferentes concentrações de tripsina para ativação e manutenção da atividade viral de RV símio SA-11, durante o período de incubação, considerando-se o número de passagens seriadas de rotavírus e a citotoxicidade produzida pela tripsina às células. As concentrações variam de 10 µg/ml no meio a 30 µg/ml para ativação em rotavírus suínos (RAMOS

et al., 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). BABIUK *et al.* (1977), relata que a infecciosidade de rotavírus símio pode ser aumentada com a adição de 10 µg/ml de tripsina 1:250 e que isolados de poucas passagens em cultura celular tendem a apresentar baixa infectividade.

Devido ao difícil cultivo, encontra-se resistência em produzir reagentes a sorotipos específicos contra RV, assim, o genoma viral tem sido muito estudado. Com técnicas de biologia molecular e disponibilidade de dados da sequência de vários sorotipos de rotavírus, foram desenvolvidos ensaios moleculares da reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (RT - PCR) e oligonucleotídeos iniciadores específicos. Estas técnicas de genotipagem têm fornecido importantes informações sobre a epidemiologia molecular do rotavírus (LINHARES, 2000; VRANJAC, 2004).

1.1.8 Rotavírus e drogas antivirais

Até 1975, pensou-se não ser possível desenvolver drogas antivirais contra vírus animais com preservação da célula hospedeira. No entanto, com a identificação de proteínas virais necessárias para a sua replicação, foi possível desenvolver drogas antivirais que agissem seletivamente nestas. A resistência a drogas antivirais tem sido importante fonte de conhecimento sobre a interação desses compostos e vírus, potencializando pesquisas em vacinas e drogas antivirais (CRUMPACKER, 2001).

São relativamente poucos os estudos sobre antirrotavirais, alguns destes mostraram que compostos sintéticos como ribavirina (nucleosídeo sintético, D-ribose acoplada a 1,2,4 triazol carboxamida), 3-deazaguanina e isoprinosina, inibem a replicação do rotavírus, sendo que ribavirina e 3-deazaguanina parecem atuar inibindo a síntese protéica viral. O composto 9-S-2,3-diidroxipropil adenina inibe a replicação do rotavirus *in vitro*, tem baixa toxicidade celular, porém o mecanismo de ação não está bem conhecido. O Clioquinol pode reduzir a infecção em camundongos se administrada em frequentes intervalos de tempo e atua removendo as proteínas do capsídeo externo (ESTES, 2001).

Foi observado que compostos polifenólicos, como o chá preto, apresentam ação inibitória contra rotavírus bovino e humano. Contudo, estes compostos não

foram estudados como fitoterápicos para humanos com infecção por rotavírus. Enquanto que extratos de ritidomas (cascas) de *Artocarpus integrifolia* (jaqueira), sementes de *Myristica fragrans* (noz-moscada), e ritidomas e folhas de *Spongias lutea* (cajazeiro) inibiram a replicação do rotavírus humano em cultivo celular de MA₁₀₄, e são usadas por conhecimento popular para combater a diarreia (CLARK, OFFIT, 2004; GOLÇALVES *et al.*, 2005).

A lactoferrina (LF) mostra atividade *in vitro* antirrotavírus símio (SA-11), impedindo a adsorção de grande parte das partículas virais na célula hospedeira, e interferindo na formação de antígenos das partículas virais que chegaram ao interior citoplasmático. Assim LF atua como barreira na adsorção e replicação viral (VAN DER STRATE *et al.*, 2001). SUPERTI e equipe (2001) demonstraram em seus estudos que resíduos de ácido siálico (AS) da membrana celular são quase totalmente removidos por lactoferrina bLf (lactoferrina bovina), apresentando significativa inibição da replicação de rotavírus símio SA-11.

Observou-se que a mucina, proteína presente no leite, na concentração de 0,1µg/mL, é capaz de inibir a replicação do rotavírus *in vitro*, atuando de maneira terapêutica, reduzindo a fase diarreica da infecção e profilática em quadro de gastroenterite animal (PETERSON, YOLKEN, NEWBURG, 1998).

É intensa a pesquisa com análogos de nucleosídeos que apresentem resposta terapêutica contra o RV, uma vez que não há opção disponível no mercado farmacêutico. As pesquisas com esses análogos mostraram que sua concentração deve ser significativamente maior em relação ao controle, AZT para a mesma eficiência com fins terapêuticos (ANGELIS *et al.*, 2007; MANTA *et al.*, 2007).

Análogos de nucleosídeos recentemente sintetizados como a 1-3-deoxi-3-fluoro- 5-S-acetil-5-tio-β-D-xilofuranose são candidatos ao desenvolvimento de uma potencial droga antiviral contra rotavírus humanos (TSOUKALA *et al.*, 2007), assim como o nucleosídeo fluoro-cetopiranosose que parece inibir a adsorção entre vírus e célula hospedeira por neutralizar a partícula viral (MANTA *et al.*, 2007).

Um peptídeo sintético correspondendo à proteína viral VP4 de RV bovino foi estudado para definir a origem da resposta imune contra RV. O pré-tratamento de células MA₁₀₄ com peptídeo inibiu a adsorção do vírus e a formação de placas de efeito citopático. *In vivo*, a administração intragástrica de VP4 ofereceu proteção contra o RV, pois o sítio de clivagem de VP4 pela tripsina é altamente conservado (IJAZ *et al.*, 1996).

1.2 Polissacarídeos e Atividade Antiviral

Polissacarídeos provenientes de bactérias, algas, vegetais de grande porte e fungos são conhecidos por possuir atividade antiviral (vírus DNA e RNA), antitumoral e anticoagulante (TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002; TALARICO *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2006).

A maioria dos polissacarídeos que apresentam atividade antiviral são altamente sulfatados, esta propriedade deve-se ao fato de serem moléculas aniônicas, capazes de reagir com partículas positivamente carregadas, como as partículas virais (GONZALEZ & CARRASCO, 1987).

A atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados parece depender da localização de seus grupos de cargas negativas e do grau de sulfatação bloqueando as cargas positivas presentes na superfície do vírus (DAMONTE *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 2003).

Polissacarídeos sulfatados sintetizados pela cianobactéria *Aphanothece halophytica* apresentaram efetiva função profilática e terapêutica contra pneumonia causada pelo vírus influenza (ZHENG *et al.*, 2006), da mesma forma que polissacarídeos sulfatados extraídos de *Grateloupia indica* apresentaram atividade antiviral contra HSV tipo 1 e 2 (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007).

Polissacarídeos sulfatados como xilogalactanas, galactanas, carragenanas, glucanas (dextranas sulfatadas), mananas e galactomananas sintetizadas a partir de várias espécies de seres vivos estão sendo intensivamente estudados desde a década de 80 por apresentarem atividade antiviral *in vitro* em alguns vírus, como herpes simplex (HSV tipo I e II), citomegalovírus humano (CMV), síndrome da imunodeficiência humana tipo 1 e 2 (HIV-1 e 2), vírus syncytial respiratório (RSV) (CARLUCCI *et al.*, 1997; COOPER, 2004; ONO 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007) e vírus da leucemia murina (murine leukemia virus- MuLV) (NAKASHIMA *et al.*, 1987; TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002). Sendo que carragenanas e xilomananas sulfatada não apresentaram atividade no teste antitrombina, sendo este fator importante quando a propriedade anticoagulante torna-se indesejável (CARLUCCI *et al.*, 1997; KOLENDER *et al.*, 1997).

1.3 Galactomananas

Entre os polissacarídeos encontrados na natureza estão as galactomananas, fibras solúveis extraídas principalmente do endosperma de sementes de leguminosas e são a segunda principal fonte de reserva energética do embrião (MERCÊ *et al.*, 2001; ONO, 2004; VENDRUSCOLO, 2005).

Estas moléculas estão sendo muito estudadas no Brasil devido ao fato da extração de galactomananas ser realizada principalmente a partir de sementes, uma fonte renovável, abundante e sem necessidade de desmatamento, com o rendimento ultrapassando 30% em relação a massa seca (ONO, 2004).

Galactomananas de sementes de leguminosas são polissacarídeos ramificados compostos por uma cadeia principal formada por resíduos de D-manopiranoose, ligados entre si por ligações O-glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, podendo esses resíduos serem substituídos por único resíduo de D-galactopiranoose ligadas a cadeia principal por ligações O-glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ (FIGURA 6), sendo que a proporção Manose:Galactose (Man:Gal) varia nas diferentes espécies. São moléculas de alto peso molecular, hidrofílicas e insolúveis em solventes orgânicos. Por sua capacidade em formar gel quando associada a outros polissacarídeos, podem controlar a atividade da água, estabilizar soluções e dispersões aquosas, e por seu alto poder espessante, as galactomananas são muito utilizadas na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia, petrolífera, como agente flocculante em tratamento de água e efluentes, e na terapia de *diabetes mellitus* (FERNANDES, NAKASHIMA, SERRA, 2004; ONO, 2004; VENDRUSCOLO, 2005; JESUS *et al.*, 2007).

Existem galactomananas de três espécies de sementes produzidas em escala industrial, a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub), goma locusta (*C. siliqua*) e goma tara (*Caesalpinia spinosa* L.) que são responsáveis pela terceira maior produção industrial mundial de polissacarídeos, perdendo apenas para celulose e amido (MERCÊ *et al.*, 2001; MATUDA, NETTO, 2005).

A goma guar, extraída do endosperma de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* L. é uma leguminosa muito usada como espessante de alimentos na Índia e Paquistão. Na forma hidrolisada apresenta as seguintes funções fisiológicas: redução da incidência de diarreia, equilíbrio da microbiota intestinal, melhoramento

do trânsito intestinal, aumento da absorção de minerais, melhora da resposta glicêmica, melhora de atrofia de vilosidades do íleo terminal, efeito de redução de colesterol e lipídeos (YOON, CHU, JUNEJA, 2008).

Além de propriedades antivirais contra HSV tipo I e II, HIV tipo I e II, e CMV, galactomananas naturalmente ou sinteticamente sulfatadas têm propriedades anticoagulantes e não são absorvidas pelo organismo humano, por isso podem ser estudadas sob a perspectiva de uso em diferentes tratamentos terapêuticos. Por ter essa propriedade testes podem ser feitos para mensurar sua atividade anticoagulante (MERCÊ *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2006). Referências sobre produção microbiana

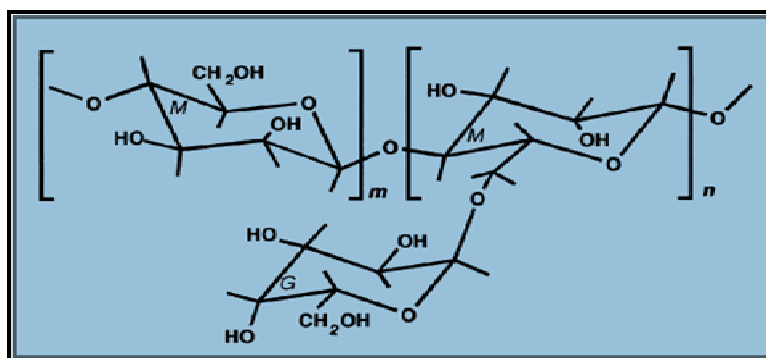


Figura 6: Estrutura geral de galactomananas.
Fonte: VENDRUSCOLO (2005).

1.3.1. *Leucaena leucocephala* (Leucena) e *Mimosa scabrella* (Bracatinga)

Leucaena leucocephala (Lam) de Wit, cuja classificação é apresentada na TABELA 1, é uma planta leguminosa arbustiva conhecida popularmente por Leucena e sinônimo botânico de *Leucaena glauca* (Willd) Benth (FIGURA 7). É um vegetal originário da América central que pode atingir até 2 metros de altura. Suas folhas são bipinadas 15 a 25 cm de comprimento, com 4 a 10 pares de pinas, cada uma com de 5 a 20 pares de folíolos. Suas flores são brancas, agrupadas em capítulo globular, seus frutos são finos e achatados (12 a 18 cm de comprimento) contendo de 15 a 25 sementes elípticas de cor marrom-brilhante que apresentam

dormência mecânica devido a rigidez do tegumento, e apresenta raízes profundas (LIMA, 1983; ONO, 2004).

A leucena é cultivada como planta forrageira, que cresce em solos de baixa fertilidade, tem rápida dispersão e apresenta valor nutritivo protéico semelhante ao da alfafa (*Medicago sativa*). É considerada excelente fonte de β -caroteno, sendo bem aceito por ruminantes, auxiliando o ganho de massa corporal e produção de leite. Na América Central, Indonésia, e Tailândia,, suas folhas e sementes são utilizadas na alimentação humana. Nas sementes também encontra-se a toxina mimosina (aminoácido não-protéico análogo da tirosina) promovendo distúrbios metabólicos como salivação, inibição do apetite, alopecia (perda de pêlos), retardo de crescimento, redução da fertilidade e casos de morte em não-ruminantes. Estes efeitos tóxicos aparecem quando a ingestão das sementes de leucena excede 50% da alimentação por mais de 6 meses (LIMA, 1983).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA DE ENGLER DA LEUCENA

	Engler
Divisão	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclasse	<i>Archichlamydeae</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Leguminosae</i>
Subfamília	<i>Mimosoideae</i>
Gênero	<i>Leucaena</i>
Espécie	<i>L. leucocephala</i> (Lam) de Wit

Fonte: ONO (2004).



Figura 7: Fotografia mostrando folhas, folíolos e flores da leucena.
 Fonte: <http://coralx.ufsm.br/herbarioflorestal> (último acesso em janeiro de 2009).

Mimosa scabrella Bentham é conhecida popularmente por bracatinga, abracatinga, bracatinho, paracaatinga, bracatinga - vermelha, bracatinga – branca, bracatinga – argentina, maracatinga, anizeiro e mandengo. Apresenta as seguintes nomenclaturas botânicas: *Mimosa scabrella* G. Bentham, *Mimosa bracaatinga* Hoehne, *Mimosa sordida* Bentham, *Mimosa bracaatinga* Hoehne var. *aspericarpa* Hoehne, *Mimosa scabrella* Bentham var. *aspericarpa* (Hoehne) Burkart (TABELA 2). O nome popular “bracatinga” tem origem indígena significando “arvore ou mata de muitas plumas brancas” (FIGURA 8) (ANGELI, 2003; ONO, 2004; VENDRUSCOLO, 2005).

A bracatinga é uma árvore perene-fólia, variedade argentina, mas não oriunda deste país, atinge entre 5 e 15 m de altura, apresenta folhas de coloração clara. Tem fenologia reprodutiva própria, florescendo entre setembro (Paraná) e janeiro (Santa Catarina). É uma espécie florestal do tipo pioneira, podendo ser plantada pela primeira vez em áreas nunca até então utilizadas para seu cultivo. Tem crescimento rápido, porém o tempo de vida é curto, entre 10 e 20 anos. Suas folhas são de textura áspera devido à presença de tricomas curtos e estrelados, de onde vem a denominação “scabrella”. Apresentam frutos do tipo vagem com textura áspera e apresentando rugosidades por assim chamado fruto aspericarpo, carregando em seu interior de 3 a 4 sementes. As sementes têm formato oval, são achatadas, rígidas,

marrom-escuras e brilhantes de 5-6 mm, apresentando com cotilédones esverdeados (BURKART, 1979; VENDRUSCOLO, 2005; ONO, 2004; MACHADO *et al.*, 2006). Os frutos apresentam queda espontânea, ou podem ser colhidos diretamente da árvore, eles são secos ao sol facilitando a sua abertura manual para extração das sementes (ANGELI, 2003). Na região sul, a maturação dos frutos ocorre entre novembro e março. A quantidade de sementes colhidas por árvore varia entre 300 g e 2 kg, sendo que há em média 58 mil a 80 mil sementes em 1 kg (ONO, 2004).

A bracatinga é muito comum na região metropolitana de Curitiba, em regiões com altitude superior a 90 m, onde ocupa em torno de 20 hectares por propriedade (VENDRUSCOLO, 2005). O plantio e desenvolvimento é facilitado por ser uma planta pouco exigente quanto às condições nutricionais do solo (FERREIRA, TAUKE – TORNISIELO, CHAVES 2002; MACHADO *et al.* 2006).

A bracatinga é a principal e mais antiga fonte de lenha do sul do País. Da semente da bracatinga, são extraídos açúcares trigalactosil-pinitol e galactomanana (ANGELI, 2003).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA DE ENGLER DA BRACATINGA

	Engler
Divisão	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclasse	<i>Archichlamydeae</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Leguminosae</i>
Subfamília	<i>Mimosoideae</i>
Gênero	<i>Mimosa</i>
Espécie	<i>M. scabrella</i> Benth

Fonte: ONO (2004).



Figura 8: Fotografia do arbusto da bracatinga. Fonte: <http://www.rarexoticseeds.com> (último acesso em janeiro de 2009).

2. Objetivos

2.1 Gerais

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial antiviral de polissacarídeos nativos e sinteticamente sulfatados de sementes das leguminosas *Leucaena leucocephala* e *Mimosa scabrella* contra o rotavírus símio (SA-11) em cultivo *in vitro*.

2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de polissacarídeos nativos e sinteticamente sulfatados de sementes das leguminosas *Leucaena leucocephala* e *Mimosa scabrella* sobre células MA₁₀₄ utilizando o método do MTT;
- Produzir e titular o vírus-trabalho rotavírus símio SA-11 em células MA₁₀₄ para os experimentos de avaliação da atividade antiviral;
- Avaliar o potencial antiviral desses polissacarídeos sobre rotavírus símio (SA-11) utilizando as metodologias de Reed & Muench e de MTT;

3. Material e Métodos

3.1 Cultivo Celular

Para o cultivo in vitro de RV, foi utilizada a linhagem celular MA₁₀₄, oriunda de células de rim de macaco. O meio de cultivo utilizado foi o DMEM–CULTILAB, suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 10% de caldo triptose fosfato (TPB) e antimicrobianos (penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL). As células utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico Marcos Enrietti – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná - SEAB - PR e estavam na passagem 27.

3.2 Multiplicação Viral

Este trabalho foi desenvolvido a partir de uma amostra isolada de RV símio SA-11, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos M. Nozawa do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL-PR).

A amostra de RV símio SA-11, agente etiológico de gastroenterite em primatas (LIPSON *et al.*, 2007), foi inicialmente passada para a linhagem celular MA₁₀₄ em garrafas de poliestireno de 25 cm², readaptando as partículas virais ao cultivo celular em 10 passagens consecutivas.

O procedimento para infecção do rotavírus requer ativação do vírus, onde a suspensão viral suplementada com tripsina [10µg/mL] foi levada ao banho-maria por 30 minutos a 37°C; a adsorção, na qual as partículas virais ativadas entram em contato com a monocamada celular foi realizada por 90 minutos a 37°C em estufa com 5% CO₂. Após a adsorção a suspensão viral permaneceu em contato com a monocamada celular e foi adicionado o meio de manutenção antimicrobianos e tripsina [5µg/mL] auxiliando na manutenção da infecção viral durante o período de incubação (FIGURA 9).

Com 72 horas de incubação, a suspensão foi congelada e descongelada por três vezes, centrifugada com 5000 rpm (centrífuga Cientec modelo CT-6000, com rotor de ângulo fixo para 8 tubos de 50mL) a 4°C por 20 minutos, e o sobrenadante aliquoteado em flaconetes, armazenados a – 80°C, em nitrogênio líquido, e usadas para a infecção de uma nova monocamada.

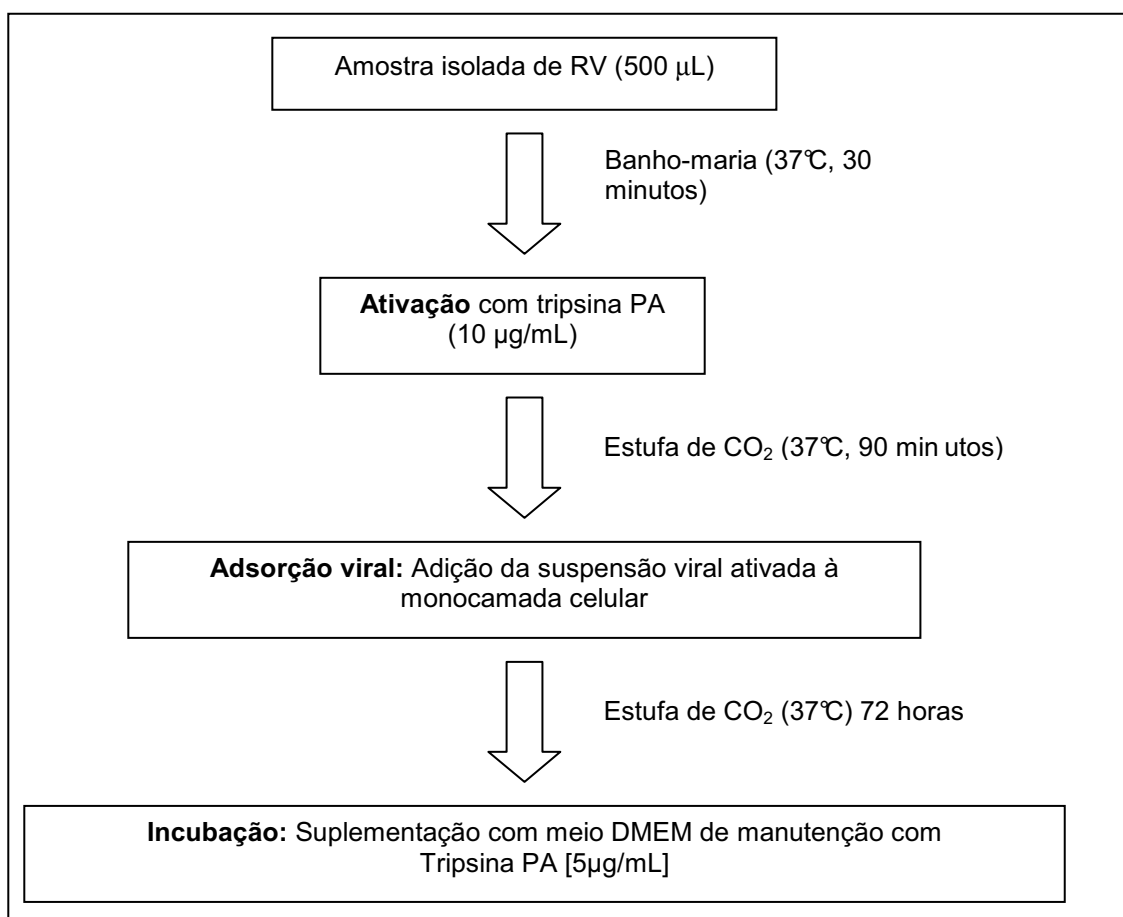


Figura 9: Fluxograma esquemático de multiplicação de RV em linhagem celular MA₁₀₄.

3.3 Titulação do rotavírus símio (SA-11)

A titulação do RV símio SA – 11 foi realizada em microplacas de 96 poços (FIGURA 10), contendo aproximadamente 125.000 células MA₁₀₄ por poço. Após a incubação de 48 horas em ambiente com 5% CO₂ a 37°C, a monocamada celular foi infectada com suspensão viral diluída em série, sendo o fator de diluição de 10

vezes, preservando uma coluna para controle negativo. Neste método, o título viral foi determinado através da contagem de poços positivos (independentemente da intensidade do ECP) e poços negativos pela observação em microscópio óptico invertido, utilizando o cálculo de Reed & Muench (1938).

3.4 Determinação da citotoxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e bracatinga em células MA₁₀₄

A citotoxicidade dos polissacarídeos, gentilmente cedidos pela Profa. Maria Rita Sierakowski – Departamento de Química – UFPR, em células MA₁₀₄ foi determinada por meio da quantificação de células viáveis pelo brometo de 3-(4'5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio (MTT). O MTT é o sal de tetrazólio que, após a clivagem por desidrogenases mitocondriais torna-se insolúvel em água pela formação de cristais de formazan, e solúvel em solventes orgânicos como o DMSO conferindo coloração roxa. Esta análise é baseada na quantificação de células viáveis pelos valores obtidos em absorbância, sendo um método de avaliação colorimétrica rápida (MATSUZAKI, 2006). A intensidade da coloração foi lida em espectrofotômetro de microplacas de ELISA (λ = 540 e 630nm) (DENIZOT, LANG, 1986; NEYTS, 1995). Os polissacarídeos nativos e sulfatados foram solubilizados (overnight) em água destilada estéril na concentração de 5mg/mL. Com a amostra solubilizada, a solução-mãe foi filtrada em membrana 0,22 μ m de poro (Millipore[®]) em ambiente estéril a fim de reduzir a possibilidade de contaminação da amostra. A amostra filtrada foi diluída em série em meio de manutenção. As galactomananas sulfatadas de leucena e de bracatinga possuem grau de derivatização ou sulfatação (DS) de 0,50 (14,3% de sulfato) e 0,62 (15,3% de sulfato), respectivamente.

As células MA₁₀₄ foram cultivadas nas microplacas de 96 poços em meio DMEM de cultivo, 125.000 células por poço. Após a monocamada celular estar completa nos poços da microplaca, aproximadamente 24 horas após incubação, o meio de cultivo celular foi retirado, e os polissacarídeos foram adicionados em diferentes concentrações (50 μ L/poço, 2500-9,8 μ g/mL, n = 8 poços). As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 90 minutos. Em seguida foram adicionados 150 μ L de meio de manutenção, totalizando volume de 200 μ L/ poço. As

microplacas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 72 horas, e visualizadas em microscópio invertido (aumento de 100 x) a cada 24 horas.

Para determinar se houve diferença significativa entre número de células MA₁₀₄ em relação ao controle sem polissacarídeos, aplicou-se o teste *t* de Student, com nível de significância de 0,05 (BOLTON, DEKKER, 1990).

3.5 Teste da atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e bracinga contra rotavírus SA-11 *in vitro*

A avaliação do potencial antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de Leucena e Bracinga, gentilmente cedidos pela Profa. Maria Rita Sierakowski – Departamento de Química – UFPR, foi determinada por meio da redução de efeito citopático *in vitro* (DAMONTE *et al.*, 1996), por meio da observação e quantificação do ECP por poço através do teste do MTT, comparando os valores de absorbância dos poços contendo polissacarídeos em relação aos poços controle sem polissacarídeo, protocolo utilizado no experimento de citotoxicidade (DISTEFANO *et al.* 1995; TAKAHASHI *et al.* 2000; BEDOYA *et al.*, 2001; NING *et al.*, 2007).

Para determinar a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados e nativos foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 100.000 células MA₁₀₄ por mililitro, cultivadas em meio DMEM de cultivo, e incubadas em estufa de CO₂ 5%, 37°C por aproximadamente 24 horas. Os polissacarídeos nativos e sulfatados foram diluídos em série em meio de manutenção, adicionando em seguida, a suspensão viral 10xTCID₅₀% (10 vezes mais concentrada que a dose infectiva de 50% em cultivo celular) ativada com tripsina (10 µg/mL) por 30 minutos em banho – maria a 37°C. Em seguida, 50 µL do conteúdo viral com polissacarídeos nativos e sulfatados foram inoculados nos poços das microplacas, e incubados nas condições de CO₂ 5% a 37°C por 90 minutos, fase em que ocorre a adsorção do vírus nas células hospedeiras. Após a adsorção viral, foram adicionados 150µL do meio de manutenção totalizando 200µL por poço, incubados durante 72 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Com 72 horas de incubação, foi possível visualizar a presença ou ausência de ECP nos poços das microplacas. Então, todo o conteúdo foi retirado, sendo adicionados 50µL de MTT por poço, incubados em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 3 horas. Após remoção do MTT, foi adicionado DMSO em todos os poços, para,

logo em seguida leitura em espectrofotômetro de leitor de microplacas de ELISA (λ = 540 e 630nm).

Nos poços de controle positivo, foi adicionada apenas suspensão viral ativada e meio de manutenção. No controle negativo foi adicionado meio de cultura. Os experimentos antivirais de polissacarídeos nativos e sulfatados de leucena e bracatinga foram realizados em triplicata.

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação do título do rotavírus símio SA-11

Utilizando a metodologia de titulação em placas de 96 poços, com contagem do número de poços que apresentavam efeito citopático (método da diluição final), foi determinado título viral de $10^{-3,5}$, indicando que nesta diluição, a amostra viral é capaz de infectar metade dos poços de teste.

A fim de aumentar o título viral, foram realizadas 10 passagens sucessivas do vírus em cultivo celular. A titulação da suspensão viral do vírus repicado 10 vezes foi realizada em microplaca de 96 poços com o resultado de $10^{-3,5}$, portanto, as passagens consecutivas em cultivo celular não aumentaram o título do RV SA – 11.

Alguns pesquisadores citam dificuldades no cultivo de RV *in vitro*. Em 1980, rotavírus da linhagem Wa tipo 2 foi adaptado em linhagem celular MA₁₀₄ após 11 passagens consecutivas em leitões recém-nascidos, assim, aumentando seu potencial infectivo (KUTSUZAWA *et al.* 1982)

RODRIGUEZ *et al.* 2004, para aumentar o título de RV símio SA - 11 no cultivo *in vitro* realizaram testes com diferentes tratamentos com tripsina cristalina pancreática, resultando na utilização do meio de manutenção suplementado com 5 µg/mL de tripsina cristalina pancreática, com a não remoção do inóculo após adsorção viral.

Experimentos sobre a concentração ideal de partículas virais precisarão ser posteriormente realizados para tentar aumentar o título do RV SA – 11 *in vitro*, otimizando o cultivo para futuros experimentos *in vivo*.

4.2 Determinação da citotoxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e bracatinga em células MA₁₀₄

Polissacarídeos de origem biológica (bactérias, algas, fungos e vegetais de grande porte) são produtos de baixa toxicidade em mamíferos, motivo pelo qual estão sendo cada vez mais pesquisados quanto às suas propriedades terapêuticas antiviral, antitumoral e anticoagulantes (TALYSHINSKY, SOUPRUN, HULEIHEL,

2002). Para todas as avaliações de atividades biológicas, recomenda-se o estudo paralelo da toxicidade das mesmas.

A análise de citotoxicidade avalia se o polissacarídeo por si é capaz de provocar alterações (efeito tóxico) na monocamada celular. A viabilidade das células MA₁₀₄ frente as galactomananas foi avaliada pelo método do MTT por meio da determinação da concentração citotóxica 50%, que seria definida como a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparado ao controle sem o polissacarídeo.

Além do teste do MTT utilizado, a monocamada celular foi visualizada em microscópio invertido para observar possíveis alterações morfológicas, complementando o resultado final de citotoxicidade.

Os polissacarídeos foram adicionados junto à monocamada celular da linhagem MA₁₀₄ homogênea e completa em microplaca de 96 poços (FIGURA 10) nas concentrações 9,8 – 2500 µg/mL (TABELAS 3, 4, 5 e 6, e GRÁFICOS 1, 2, 3 e 4) e diluídos em meio de manutenção, gerando a faixa de concentrações final de 625-2,45 µg/mL. Essa faixa de concentrações foi escolhida para que pudessem ser avaliadas pelo menos 10 concentrações diferentes de polissacarídeos. Como os polissacarídeos sulfatados de bracinga e de leuceuna apresentam massas moleculares de 620×10^3 e 574×10^3 g/mol, formando soluções viscosas que dificultam a filtração esterilizante através de filtros de membranas de 0,22 µm acima de determinadas concentrações. Os polissacarídeos foram mantidos em contato com a monocamada celular por 90 minutos (tempo necessário para adsorção viral) e após este período, 150 µL de meio de manutenção foi adicionado aos poços e incubado por 72 horas.

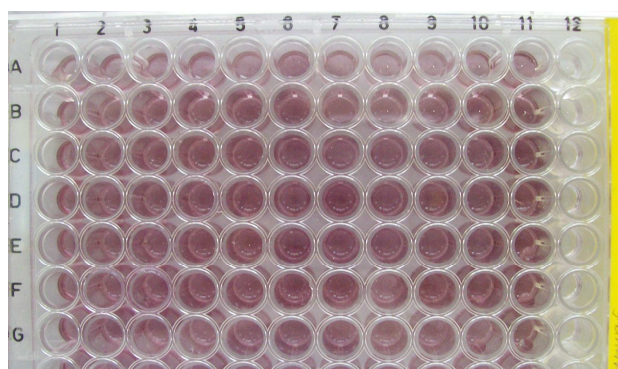


Figura 10: Fotografia de uma microplaca de 96 poços contendo DMSO em reação com cristais de formazam formando coloração roxa, lida em escala de absorbância no teste de citotoxicidade dos polissacarídeos.
Fonte: O autor.

Os resultados foram obtidos em valores de absorbância em espectrofotômetro de microplacas de ELISA ($\lambda = 540$ e 630nm) de cada poço e convertidos a porcentagem de células viáveis. Para determinar a citotoxicidade dos polissacarídeos testados a partir dos dados de absorbância foi utilizado o teste estatístico t de Student. Este analisa a diferença estatisticamente significativa entre a média de absorbância dos poços controle positivo, sem polissacarídeos (100% de células viáveis), e as amostras com polissacarídeos.

As células também foram observadas em microscópio invertido a cada 24 horas, até 72 horas de incubação, não havendo diferença morfológica entre o controle negativo (FIGURA 11) e os poços com a galactomanana nativa de leucena (FIGURA 12), galactomanada nativa e sulfatada de bracinga (FIGURA 13 e 14) abaixo de $156,2 \mu\text{g/mL}$. A galactomanana sulfatada de leucena (FIGURA 14) apresentou pequena alteração com observação de células mais alongadas que no controle negativo (FIGURA 11), resultado confirmado posteriormente com o teste do MTT.

Na TABELA 3, estão demonstrados os resultados do experimento com a galactomanana nativa de leucena, o qual indica, por meio do teste t , que o polissacarídeo nas concentrações entre $2,45 - 625 \mu\text{g/mL}$ não apresentou toxicidade em MA_{104} . Os dados mostram que houve aumento no número células em algumas concentrações na presença do polissacarídeo (de 7,1 a 12,5% mais células em relação ao controle positivo – sem o polissacarídeo) nas concentrações entre $78 - 625\mu\text{g/mL}$ (TABELA 3; GRÁFICO 1). Esses dados sugerem reação estimulatória do polissacarídeo em MA_{104} , que deverá ser melhor estudada para um parecer definitivo, pois na literatura, até o momento, não há informações sobre a relação entre polissacarídeos e estudos de viabilidade celular frente à linhagem celular MA_{104} , ressaltando-se a necessidade de mais estudos sobre a proposta de resposta estimulatória do crescimento celular em exposição a galactomanana nativa de leucena.

A análise da citotoxicidade da galactomanana sulfatada de leucena (TABELA 4; GRÁFICO 2) sugere que este polissacarídeo deva ser utilizado no cultivo *in vitro* de MA_{104} em concentrações inferiores a $78 \mu\text{g/mL}$. Nas concentrações de 625, 312 e $156 \mu\text{g/mL}$ apresentaram respectivamente 77,3% ($\text{CC}_{77,3}$), 75,6% ($\text{CC}_{75,6}$) e 35,3%

(CC_{35,3}) menos células em relação ao controle positivo, determinando assim, que estas três concentrações são citotóxicas (CC₅₀ de aproximadamente 255 µg/mL).

Por sua vez, com a galactomanana nativa de *Mimosa scabrella* (TABELA 5; GRÁFICO 3) nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade, assim como alterações morfológicas nas células MA₁₀₄.

O último polissacarídeo testado foi a galactomanana sulfatada de *Mimosa scabrella*, o qual apresentou efeito citotóxico na concentração de 625 µg/mL, reduzindo em 24,0% o número de células viáveis (CC_{24,0}) (TABELA 6; GRÁFICO 4), portanto, com CC₅₀ > 625 µg/mL.

Estes resultados sugerem que a galactomanana sulfatada de bracinga é a menos citotóxica para as células MA₁₀₄ nas condições analisadas.

Os polissacarídeos sulfatados, kappa/iota/nu carragenana e xilomananas extraídas de algas marinhas não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações abaixo de 1000 µg/mL em linhagem de células Vero (TALARICO, et al., 2004; MANDAL et al., 2008). Com xilogalactanas, DAMONTE et al., (1996) apresentaram o mesmo resultado para citotoxicidade em células vero, assim como GONZÁLEZ, ALARCÓN, CARRASCO, (1987) com iota-carragenana em linhagem celular HeLa.

Como é relatada baixa citotoxicidade *in vitro* para polissacarídeos de algas que apresentam grau de sulfatação (DS) superior ao das amostras testadas, e considerando-se que as amostras de galactomanana sulfatada de leucena e de bracinga, apresentam respectivamente DS de 0,50 e 0,62, sugere-se que resíduos de reagentes utilizados na reação de sulfatação (como a piridina e a formamida) possam estar interferindo na viabilidade celular.

TABELA 3: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA EM CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT

	CN ^a	CP ^b	625,0 ^c	312,5 ^c	156,3 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c
Média de células viáveis (%)		100	111,2	114,0	108,1	110,2	105,8	100,0	18,4	102,8	18,7
Variância		0,4413	0,6472	0,3954	0,5746	0,5754	0,6057	0,2509	0,8821	0,9057	0,3917
Teste F			1,4665	1,1159	1,3021	1,3039	1,3725	2,8345	1,9988	2,0523	1,1267
Teste T			3,0137	4,2923	2,2573	2,8352	1,5818	0,0051	0,4243	0,6572	0,4361
Diferença Em relação Ao CP (%)			11,1	12,5	7,1	9,4	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos;

^cConcentração em µg/mL (2,45 - 625 µg/mL ou 0,225-125 µg/poço); Ftabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); Ttabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

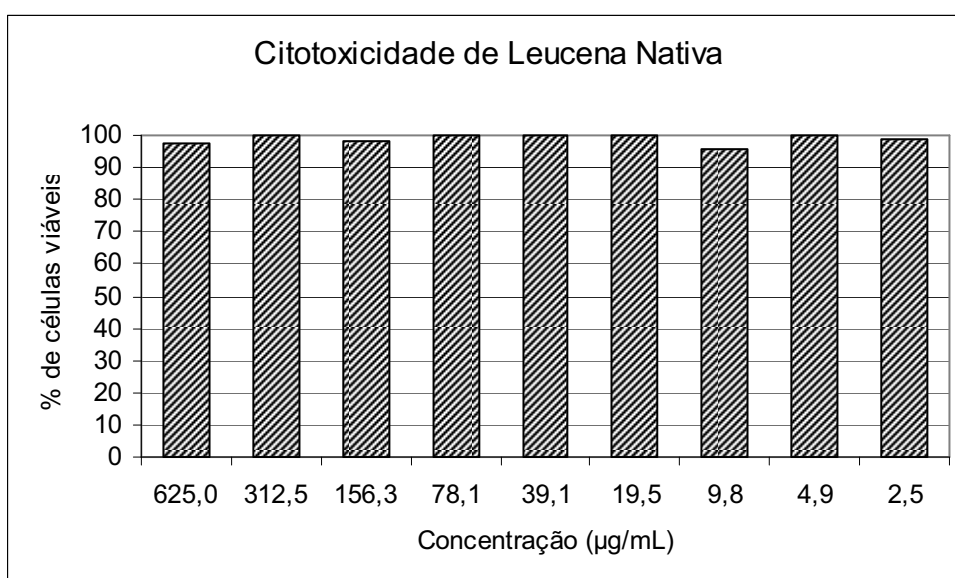


Gráfico 1: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana nativa de *Leucaena leucocephala* em experimento durante e pós-adsorção com período de incubação de 72 horas.

TABELA 4: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE LEUCENA EM CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT

	CN ^a	CP ^b	625,0 ^c	312,5 ^c	156,3 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c
Média de células viáveis (%)		100,3	22,7	24,4	64,9	78,6	81,1	85,4	79,9	85,1	84,2
Variância		15,476	15,476	3,560	1,736	1,916	4,309	2,540	2,292	4,654	5,558
Teste F			10,728	4,3469	8,9167	8,0755	3,5916	6,0931	6,7500	3,3253	2,7846
Teste T			5,3331	4,9171	2,4113	1,4374	1,2193	0,9938	1,4010	0,9581	0,9899
Diferença Em relação Ao CP (%)			77,3	75,6	35,3	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/mL (2,45 - 625µg/mL ou 0,225 - 125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

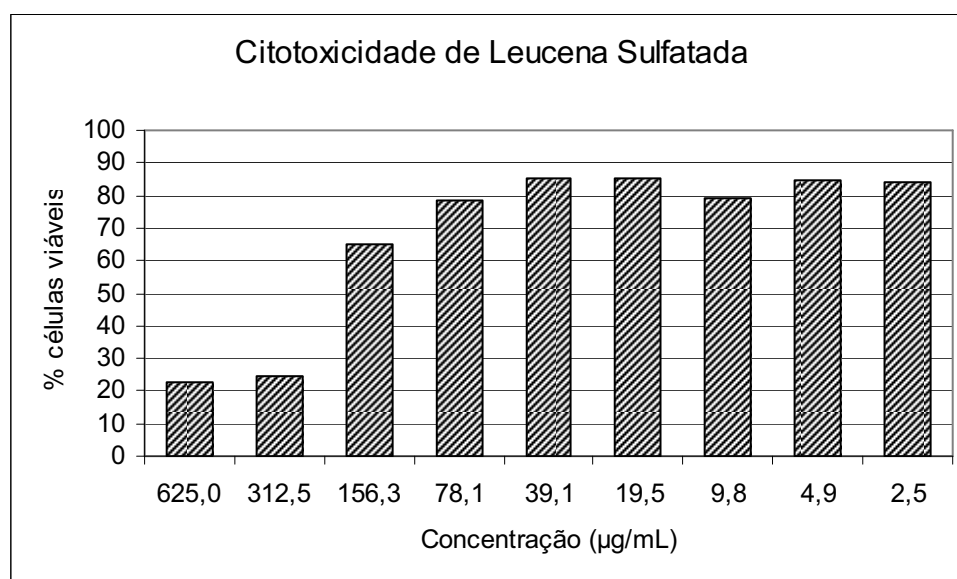


Gráfico 2: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana sulfatada de *Leucaena leucocephala* em experimento durante e pós-adsorção com período de incubação de 72 horas

TABELA 5: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE BRACATINGA EM CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT

	CN ^a	CP ^b	625,0 ^c	312,5 ^c	156,3 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c
Média de células viáveis (%)		100,0	96,4	101,1	100,1	99,1	96,9	97,5	97,1	100,7	101,2
Variância		0,3582	0,8618	0,7124	0,6405	0,9097	0,5447	0,3176	0,6300	0,8336	0,9165
Teste F			2,4062	1,9891	1,7883	2,5379	1,5208	1,1278	1,7589	2,3274	2,5589
Teste T			0,9232	0,3008	0,0270	0,2284	0,9273	0,8863	0,8712	0,1771	0,3002
Diferença Em relação Ao CP (%)			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos;

^cConcentração em µg/mL (625-2,45 µg/mL ou 0,225-125 µg/poço); Ftabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); Ttabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

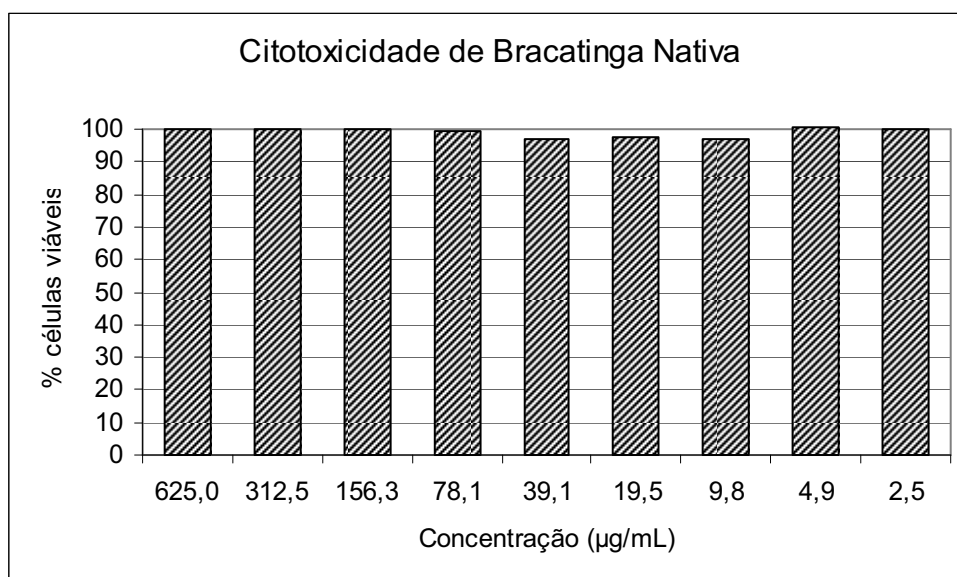


Gráfico 3: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana nativa de *Mimosa scabrella* em experimento durante e pós-adsorção com período de incubação de 72 horas.

TABELA 6: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE BRACATINGA EM CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT

	CN ^a	CP ^b	625,0 ^c	312,5 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c
Média de células viáveis (%)		100,0	76,0	86,1	106,1	82,6	84,8	90,7	88,6	86,8
Variância		4,5885	0,6023	1,2402	8,9179	3,2984	0,5747	1,0503	1,2757	2,6206
Teste F			7,6189	3,6999	1,9435	1,3911	7,9841	4,3689	3,5967	1,7509
Teste T			2,9711	1,6252	0,4751	1,7425	1,8880	1,1134	1,3175	1,3810
Diferença Em relação Ao CP (%)			24,0	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/mL (2,45 – 625 µg/mL ou 0,225-125 µg/poço); 156,3 = amostra contaminada; F_{tabelado} = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T_{tabelado} para variâncias iguais = 2,14 (α = 0,05, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

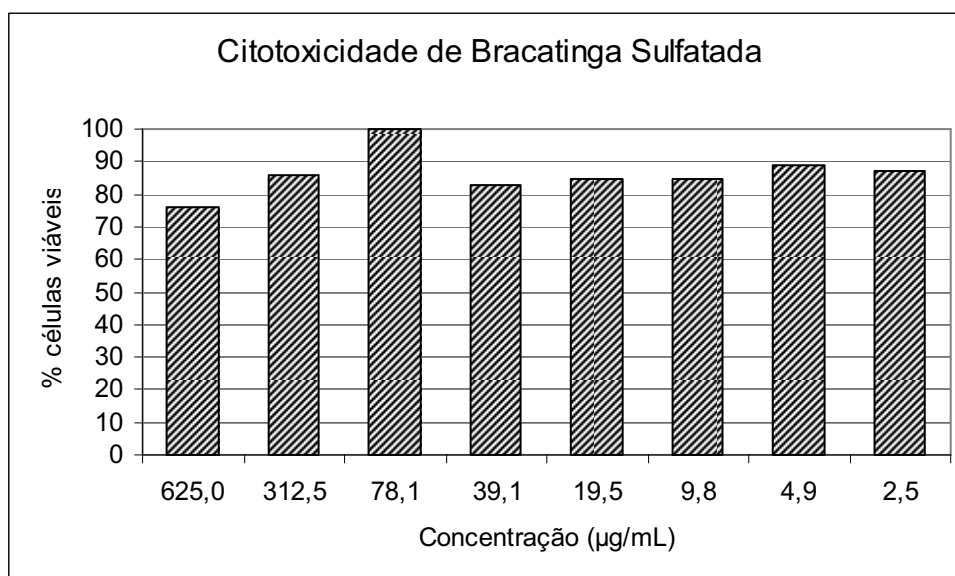


Gráfico 4: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana sulfatada de *Mimosa scabrella* em experimento durante e pós-adsorção com período de incubação de 72 horas.



Figura 11: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄, controle negativo, no teste de citotoxicidade das galactomananas nativas de leucena e bracatinga, 72 horas de incubação. Aumento de 100X
Fonte: O autor



Figura 12: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ no teste de citotoxicidade da galactomanana nativa de leucena [156,3 µg/mL], 72 horas de incubação. Aumento de 100X
Fonte: O autor



Figura 13: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ no teste de citotoxicidade de galactomanana sulfatada de leucena [156,3 µg/mL], 72 horas de incubação. Aumento de 100X
Fonte: O autor



Figura 14: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ no teste de citotoxicidade de galactomanana de bracinga nativa [156,3 µg/mL], 72 horas de incubação. Aumento de 100X
Fonte: O autor

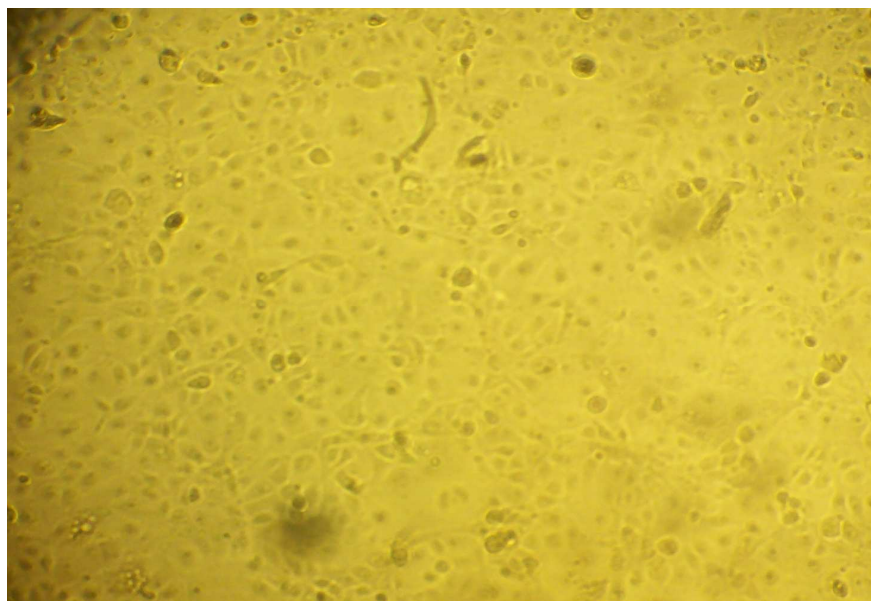


Figura 15: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ no teste de toxicidade de galactomanana de bracinga sulfatada em concentração de [156,3 µg/mL], 72 horas de incubação. Aumento de 100X
Fonte: O autor

4.3 Teste de atividade antiviral in vitro das galactomananas nativas e sulfatadas de Leucena e Bracinga contra o rotavírus símio SA - 11

A avaliação da atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e bracinga contra RV SA – 11 foi realizada pelo ensaio de diluição final de Reed & Muench (1938) em células MA₁₀₄ representados na forma de CI50 (concentração inibitória de 50%, concentração na qual metade das unidades-teste deixariam de apresentar efeito citopático – ECP induzido pelo rotavírus símio SA-11) utilizando a concentração viral de 10xTCI50 (dose infecciosa 50% em cultura de tecidos, 10 vezes a diluição viral onde metade das unidades-teste apresentam ECP, portanto uma diluição onde 100% das unidades-teste estão infectadas).

As galactomananas sulfatadas foram testadas nas maiores concentrações não citotóxicas em microplacas de 96 poços, com a adição do polissacarídeo durante e após adsorção em suspensão viral. Não houve diferença significativa entre efeito citopático nas células do controle positivo (suspensão viral sem polissacarídeo) e células com vírus e polissacarídeos, tendo como base a morfologia

da monocamada do controle negativo (sem suspensão viral e sem polissacarídeo). Portanto o efeito citopático foi semelhante ao do controle infectado. As análises foram realizadas em microscópio invertido (aumento de 100x) (figuras 16, 17, 18 e 19).

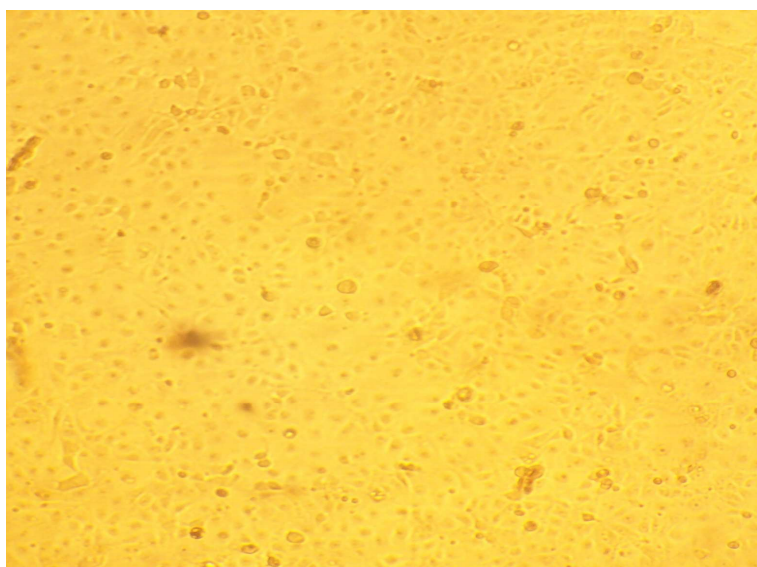


Figura 16: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄, não infectada e sem polissacarídeo – controle negativo, 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

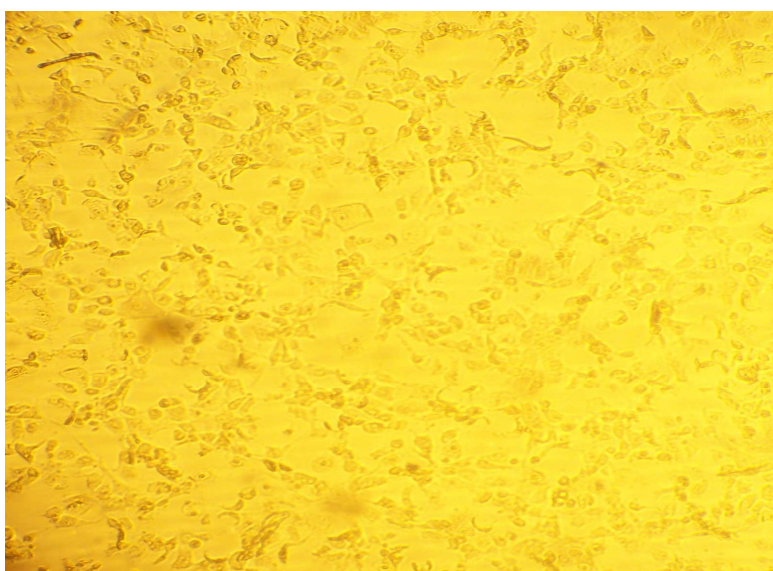


Figura 17: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA – 11, 10xTCID₅₀, ausência de polissacarídeo, controle positivo, 72h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

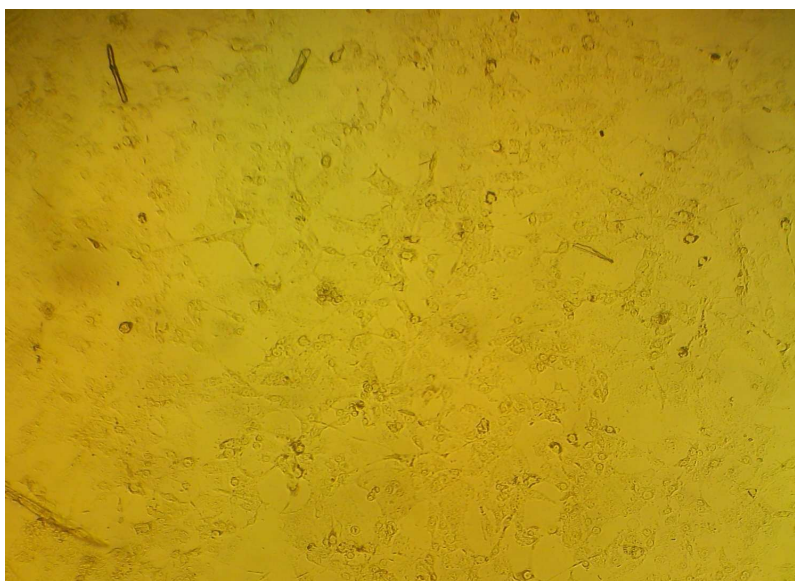


Figura 18: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀ com galactomanana sulfatada de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

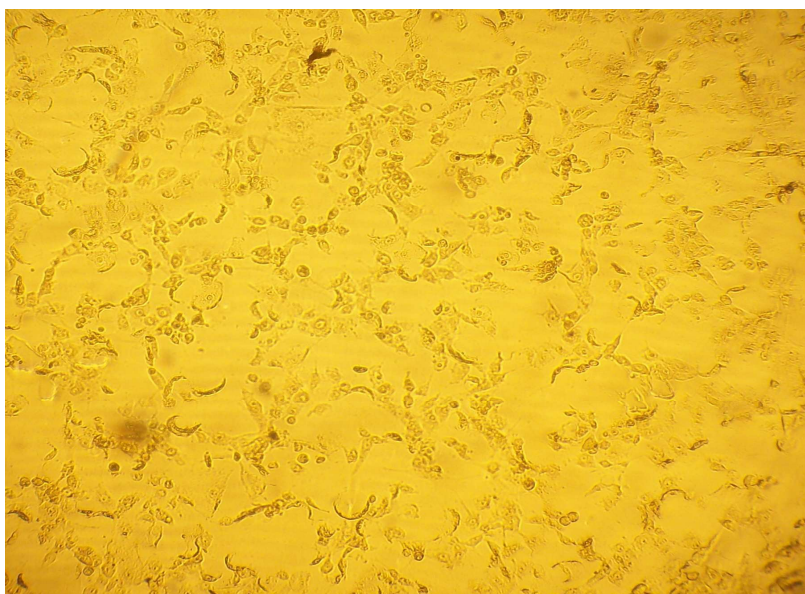


Figura 19: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana sulfatada de bracatinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

Uma vez que não houve inibição perceptível do ECP do RV SA - 11 na presença dos polissacarídeos sulfatados de leucena (figura 18) e bracatinga (figura 19), à maior concentração não citotóxica, de 156,3 µg/mL, posteriormente, a atividade antiviral desses polímeros foi avaliada pela redução do título viral em

garrafas de cultivo infectadas com a suspensão viral (10x TCID₅₀) (ONO *et al.*, 2003; GONÇALVES, 2005). Os títulos virais das amostras foram comparados com o título viral do controle positivo (figura 20) e controle negativo (figura 21).

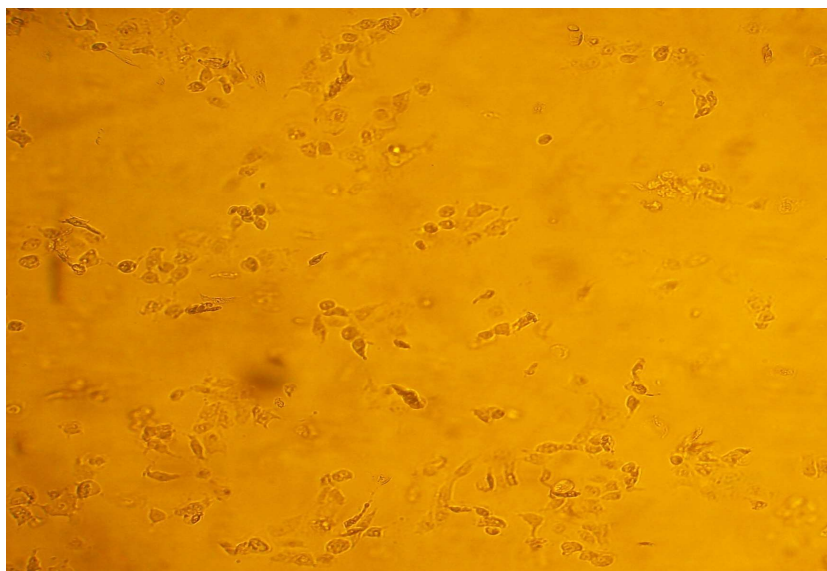


Figura 20: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, ausência de polissacarídeo - controle positivo, 72h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

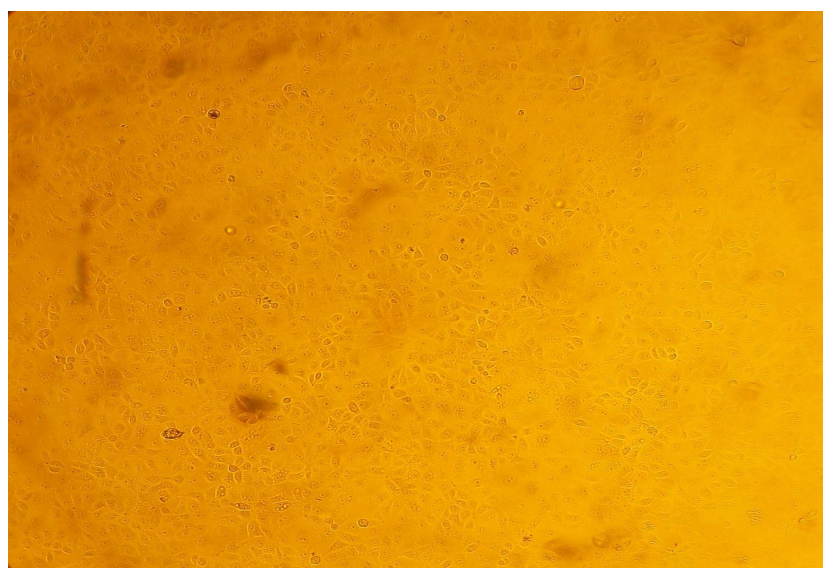


Figura 21: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄, não infectada e sem polissacarídeo – controle negativo, 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

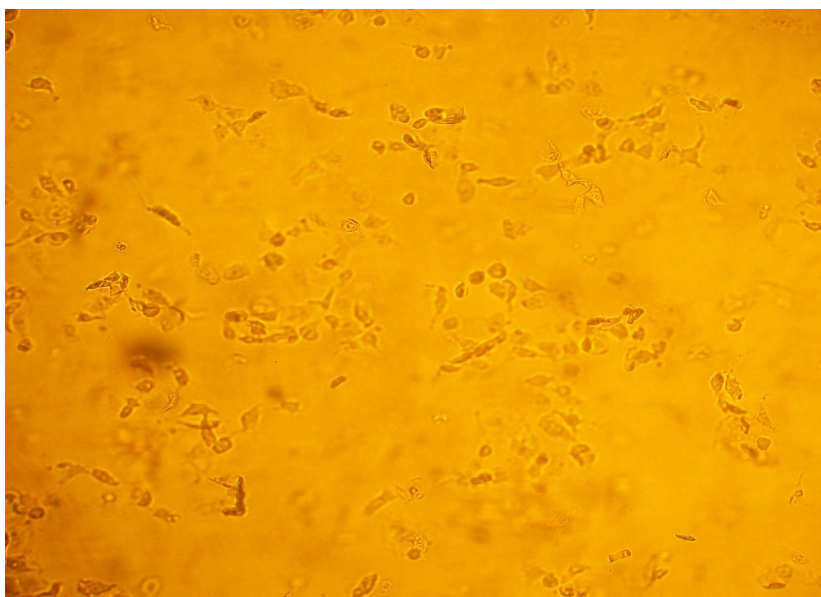


Figura 22: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana nativa de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor

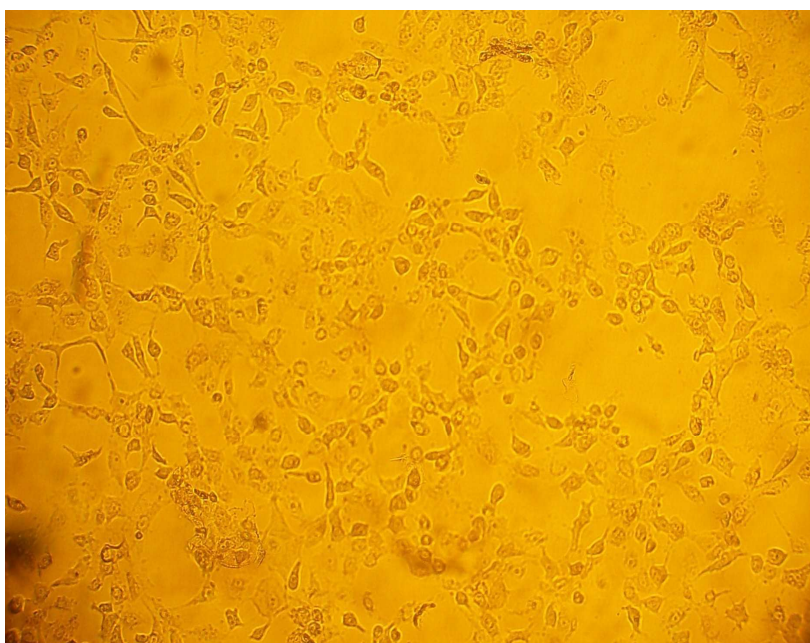


Figura 23: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana sulfatada de leucena em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

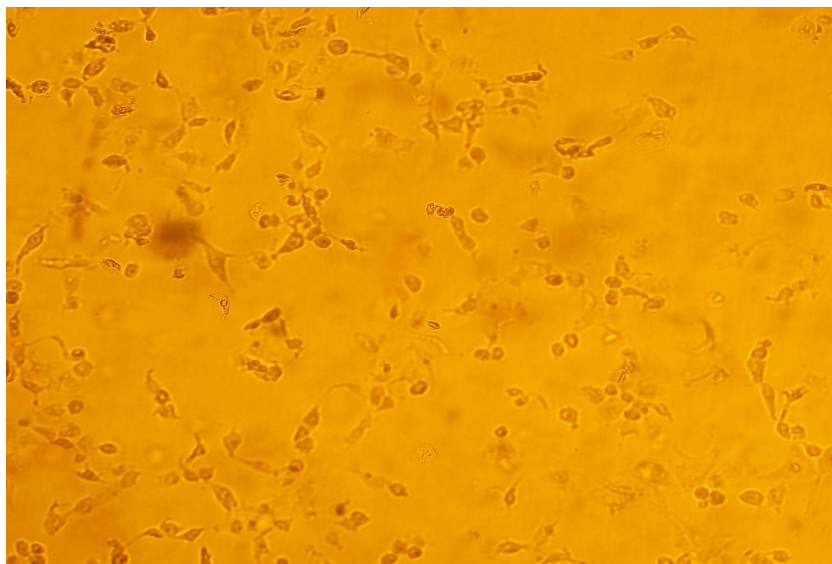


Figura 24: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana sulfatada de bracinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

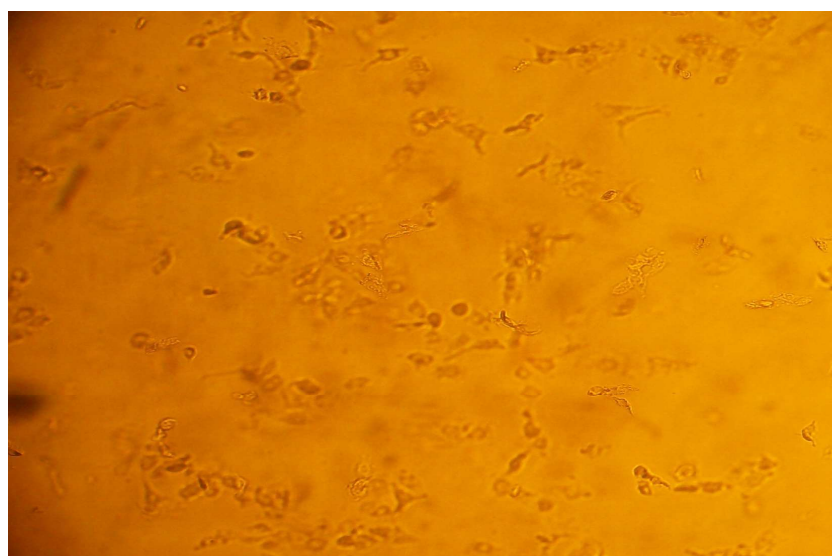


Figura 25: Fotomicrografia da monocamada celular de MA₁₀₄ infectada com RV SA-11, 10xTCID₅₀, com galactomanana sulfatada de bracinga em concentração de [156,3 µg/mL], 72 h de incubação. Aumento de 100X.
Fonte: O autor.

Quando a monocamada estava tomada por ECP, tendo como referência o controle positivo (FIGURA 20), 72 horas após a infecção, as garrafas contendo apenas vírus ou vírus e polissacarídeos (FIGURAS 20 a 25) foram congeladas e

descongeladas por 3 vezes, o conteúdo foi centrifugado separando os fragmentos celulares da suspensão viral. A suspensão resultante da centrifugação foi coletada e titulada em microplacas de 96 poços.

O resultado da titulação foi o mesmo entre as amostras contendo os polissacarídeos nativos ou sulfatados, e controle positivo, de $10^{-3,5}$, não apresentando efeito citopático nas amostras de controle negativo.

Com o resultado obtido no experimento acima descrito, não foi possível observar atividade antirrotaviral a partir dos polissacarídeos nativos e sulfatados. Assim, o último experimento antirrotaviral que realizamos foi em microplacas de 96 poços com monocamada completa e homogênea de MA₁₀₄ onde diluímos as galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e bracatinga (0,6 - 156,3 µg/mL ou 0,03 - 7,8 µg/poço, n = 8 poços), entrando em contato com poços infectados com suspensão viral de RV SA -11, 10xTCID₅₀.

Neste teste a leitura das microplacas de 96 poços foi realizada através do leitor de ELISA ($\lambda = 540$ e 630nm). O resultado foi obtido em absorbância e após isso, convertidos em porcentagem de células viáveis, tendo como referência controles sem polissacarídeos e sem suspensão viral (controle negativo), determinando 100% de células viáveis.

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com as seguintes equações:

- Variância ponderada (se o valor de F for igual ou menor ao do tabelado)

$$Sp^2 = [(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2]/(n_1+n_2-2);$$

- t calculado

$$(Média\ 2 - Média\ 1) / Raiz\ quadrada\ de\ Sp^2(1/n_1 + 1/n_2);$$

- Intervalo de confiança entre médias (IC)

$$(Média\ 2 - Média\ 1) \pm [t\ tab \times desvio\ padrão\ ponderado \times raiz\ quadrada\ de\ (1/n_1 + 1/n_2)];$$

- Desvio padrão ponderado

$$Sp = raiz\ quadrada\ de\ Sp^2;$$

- Se o valor de F foi maior que o tabelado, precisa recalcular os graus de liberdade da amostra e portanto o t tabelado será diferente:

$$Graus\ de\ liberdade\ da\ amostra = \{(\omega_1 + \omega_2)^2 / [\omega_1^2 / (n_1 + 1)] + [\omega_2^2 / (n_2 + 1)]\} - 2$$

$$Onde\ \omega_1 = S_1^2/n_1\ e\ \omega_2 = S_2^2/n_2$$

Esta análise demonstrou que as galactomananas nativa e sulfatada de leucena não apresentam ação antiviral contra RV SA-11 *in vitro*. Não tendo sido encontrada diferença significativa entre a porcentagem de células viáveis no controle positivo e nas amostras com o polissacarídeo nas diferentes concentrações avaliadas (TABELA 7, GRÁFICO 5 e TABELA 8, GRÁFICO 6). Este resultado corrobora com os dados obtidos no ensaio de avaliação do título viral (FIGURAS 22 e 23), os quais não houve alteração do título viral no controle positivo (FIGURAS 20) apenas com a suspensão viral e após adição dos polissacarídeos.

A galactomanana nativa de bracinga, de acordo com o experimento com MTT (TABELA 9, GRÁFICO 7), não apresentou atividade antiviral contra RV SA - 11 *in vitro*, assim como no teste de titulação viral não houve diferença entre o título viral do controle positivo em relação à monocamada celular contendo BN (FIGURA 24). Com a galactomanana sulfatada de bracinga, no teste de titulação viral (FIGURA 25), observou - se que o título do RV SA-11 foi o mesmo do controle positivo (FIGURA 20). No entanto, com a análise do MTT diferenças significativas quanto à porcentagem de células viáveis foram encontradas nas amostras com BS e controle positivo. Esses resultados demonstram que a fração polissacarídica inibiu a citotoxicidade do RV SA – 11 em linhagem celular MA₁₀₄ (TABELA 10, GRÁFICO 8). Os dados da TABELA 10 indicam que abaixo de 156,3 µg/mL, há entre 6,1-13,5% mais células viáveis na presença do polissacarídeo sulfatado da bracinga quando comparado ao controle positivo (monocamada infectada apenas com suspensão viral). A concentração inibitória de 50% do efeito citotóxico (CI₅₀) da galactomanana sulfatada da bracinga é superior a 156,3 µg/mL, a maior concentração testada.

Este último experimento foi desenvolvido com o intuito de detectar pequenas, porém significativas alterações na quantidade de células viáveis entre amostras e controle positivo, que não seriam perceptíveis em simples observação visual determinando o título viral.

TABELA 7: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA SOBRE CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE E APÓS ADSORÇÃO (VALORES EM PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS)

	CN ^a	CP ^b	156,2 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c	1,2 ^c
Média de células viáveis (%)	100,0	10,9	12,0	11,9	8,2	12,1	9,3	10,2	8,2	17,9
Variância	3,9081	6,1805	1,2785	1,7135	0,763	1,4857	1,1614	2,2496	1,1092	1,1986
Teste F			4,834	3,606	8,100	4,159	5,321	2,747	5,571	3,112
Teste T			0,2185	0,1972	0,5010	0,2214	0,2880	0,1276	0,5084	1,2790
Diferença Em relação ao CP (%)			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço com células, sem vírus e sem polissacarídeo; ^bControle positivo = poço com células, com vírus e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/mL (1,2 - 156,3 µg/mL ou 0,06 - 7,8 µg/poço); F_{tabelado} = 1,89 (47 graus de liberdade de numerador e 23 graus de liberdade de denominador); T_{tabelado} para variâncias iguais = 1,99 (α = 0,05, bilateral, 48 + 24 – 2 = 70 graus de liberdade).

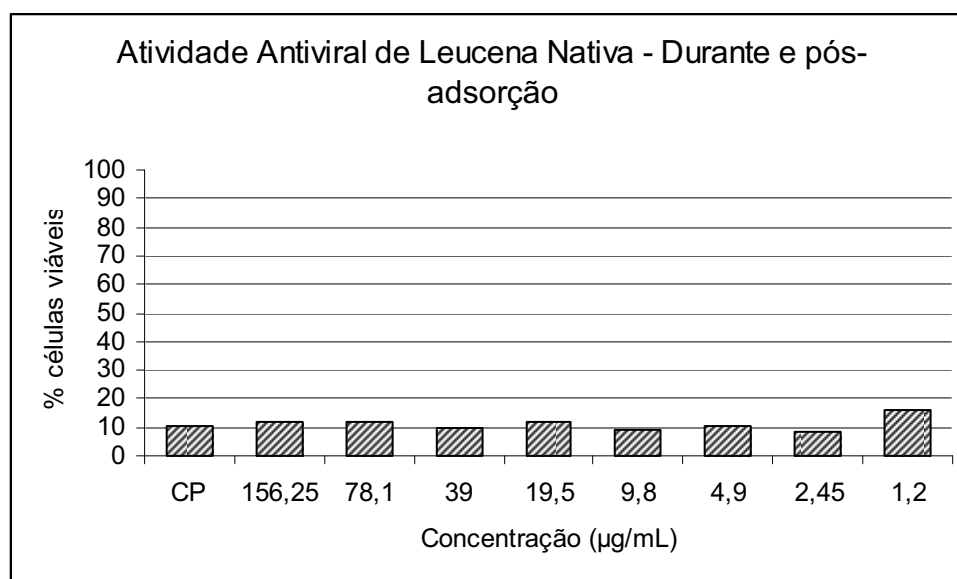


Gráfico 5: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana nativa de *Leucaena leucocephala* [1,2 - 156,3 µg/mL] adicionadas durante e após adsorção viral.

TABELA 8: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DA GALACTOMANANA SULFATADA DE LEUCENA SOBRE CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE E APÓS ADSORÇÃO (VALORES EM PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS)

	CN ^a	CP ^b	156,2 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c	1,2 ^c
Média de células viáveis (%)	100,0	17,2	20,1	19,8	19,0	19,2	17,9	18,5	19,2	20,4
Variância	1,3448	1,0162	0,8304	0,7715	0,9138	0,9257	0,8937	0,8464	0,7535	0,6187
Teste F			1,223	1,317	1,111	1,097	1,136	1,200	1,348	1,642
Teste T			1,182	1,070	0,716	0,779	0,289	0,501	0,817	1,348
Diferença Em relação ao CP (%)			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço com células, sem vírus e sem polissacarídeo; ^bControle positivo = poço com células, com vírus e sem polissacarídeos ^cConcentração em µg/mL (1,2 - 156,3 µg/mL ou 0,06 - 7,8 µg/poço); F_{tabelado} = 1,89 (47 graus de liberdade de numerador e 23 graus de liberdade de denominador); T_{tabelado} para variâncias iguais = 1,99 (α = 0,05, bilateral, 48 + 24 – 2 = 70 graus de liberdade).

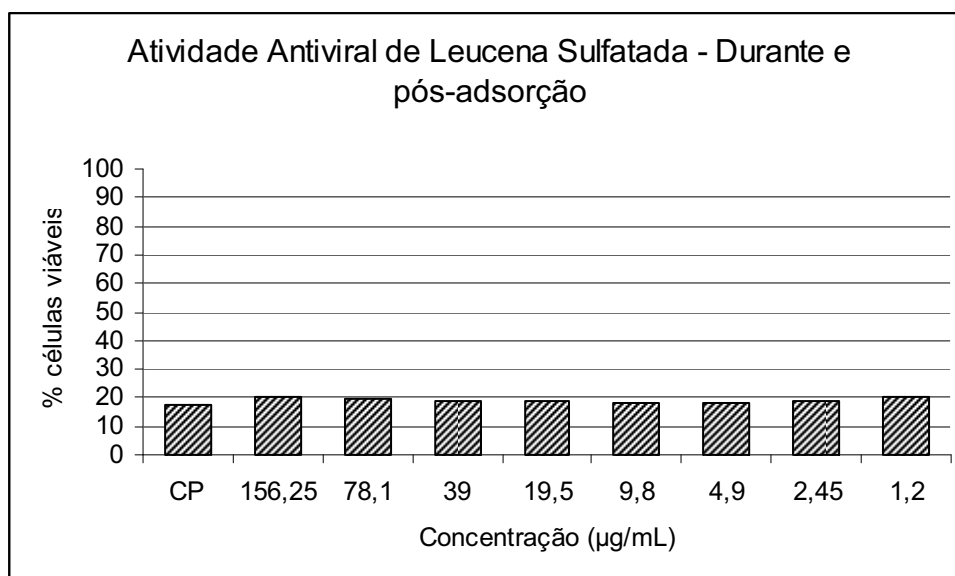


Gráfico 6: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana sulfatada de *Leucaena leucocephala* [1,2 - 156,3 µg/mL] adicionadas durante e após adsorção viral.

TABELA 9: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA BRACATINGA SOBRE CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE E APÓS ADSORÇÃO (VALORES EM PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS)

	CN ^a	CP ^b	156,2 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c	1,2 ^c
Média de células viáveis (%)	100,0	9,2	12,4	11,6	12,7	12,6	12,6	13,6	11,9	11,0
Variância	3,0116	1,5366	2,2789	1,6929	1,9741	2,0606	1,9949	2,0926	1,7845	1,6422
Teste F			1,483	1,101	1,284	1,341	1,298	1,361	1,161	1,068
Teste T			0,9601	0,7759	1,086	1,053	1,041	1,348	0,862	0,576
Diferença Em relação ao CP (%)			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço com células, sem vírus e sem polissacarídeo; ^bControle positivo = poço com células, com vírus e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/mL (1,2 - 156,3 µg/mL ou 0,06 - 7,8 µg/poço); F tabelado = 1,89 (47 graus de liberdade de numerador e 23 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 1,99 ($\alpha = 0,05$, bilateral, $48 + 24 - 2 = 70$ graus de liberdade).

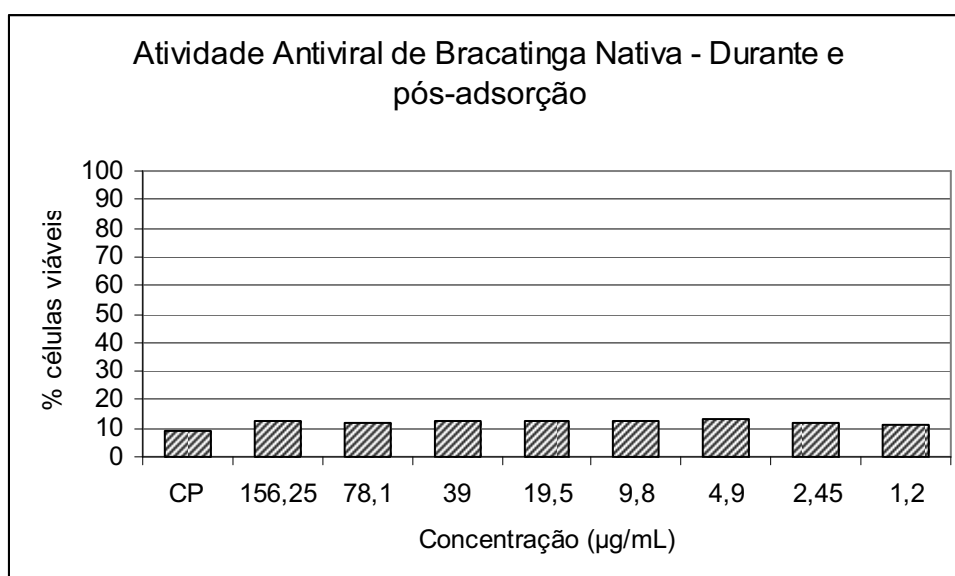


Gráfico 7: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis em presença da galactomanana nativa de *Mimosa scabrella* [1,2 - 156,3 µg/mL] em experimento durante e pós-adsorção com período de incubação de 72 horas.

TABELA 10: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DA GALACTOMANANA SULFATADA DE BRACATINGA SOBRE CÉLULAS MA₁₀₄ PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE E APÓS ADSORÇÃO (VALORES EM PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS)

	CN ^a	CP ^b	156,2 ^c	78,1 ^c	39,0 ^c	19,5 ^c	9,8 ^c	4,9 ^c	2,5 ^c	1,2 ^c
Média de células viáveis (%)	100,0	13,5	18,8	20,6	21,5	22,0	21,3	24,3	24,9	25,2
Variância	0,4728	0,4659	0,6204	0,4400	0,3908	0,3414	0,4790	0,3951	0,3803	0,2972
Teste F			1,331	1,058	1,192	1,364	1,028	1,179	1,225	1,567
Teste T			2,938	4,128	4,802	5,185	4,546	6,479	6,898	7,282
Diferença Em relação ao CP (%)			+6,1	+8,2	+9,2	+9,8	+9,0	+12,5	+13,2	+13,5

^aControle negativo = poço com células, sem vírus e sem polissacarídeo; ^bControle positivo = poço com células, com vírus e sem polissacarídeos ^cConcentração em µg/mL (1,2 - 156,3 µg/mL ou 0,06 - 7,8-µg/poço); F_{tabelado} = 1,89 (47 graus de liberdade de numerador e 23 graus de liberdade de denominador); T_{tabelado} para variâncias iguais = 1,99 (α = 0,05, bilateral, 48 + 24 - 2 = 70 graus de liberdade).

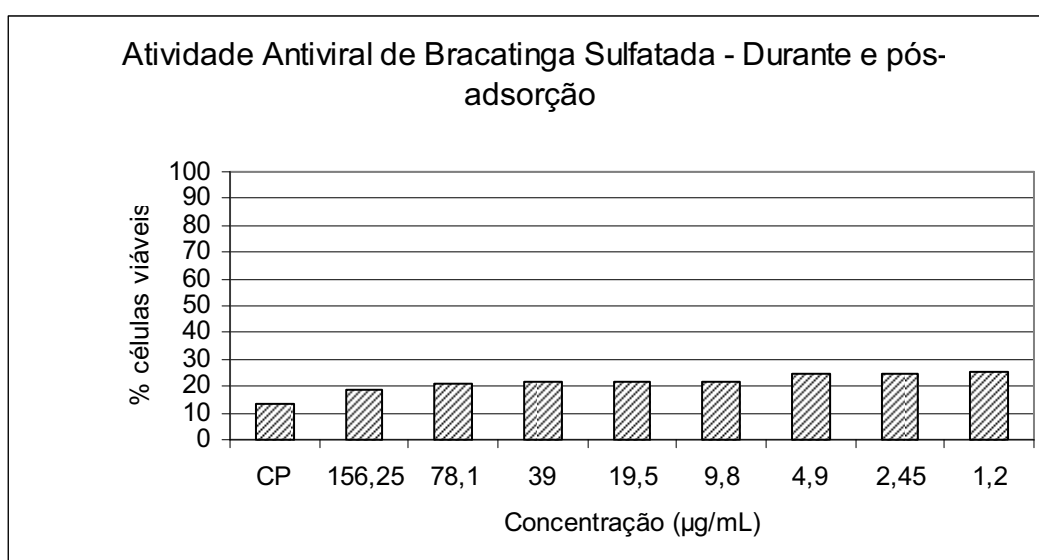


Gráfico 8: Porcentagem de células MA₁₀₄ viáveis avaliando a atividade antiviral da galactomanana sulfatada de *Mimosa scabrella* 1,2 - 156,3 [µg/mL] adicionadas durante e após adsorção viral.

Têm sido relatadas pesquisas sobre atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados contra vírus HVS-1 e HSV- 2 (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007), HIV-1 e HIV- 2 (inibindo a atividade da enzima transcriptase reversa) (TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002), vírus da leucemia murina (MuLV) (NAKASHIMA *et al.*, 1987), citomegalovírus (CMV) (BABA *et al.*, 1988). BABA *et al.* (1988), vírus da dengue, febre amarela (ONO *et al.*, 2003) e papilomavirus (BUCK *et al.*, 2006), entre outros.

De modo geral, a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados refere-se à inibição da adsorção de vírus envelopados, competindo com a molécula glicosaminoglicana heparan sulfato presente na superfície da célula hospedeira (HEROLD *et al.*, 1994; ZACHAROPOULOS, PHILLIPS, 1997; TALARICO *et al.*, 2006). No entanto, diferentes drogas antivirais poderiam atuar em outras etapas do ciclo de replicação viral: adsorção, penetração, fusão ou síntese protéica viral (TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002).

GONZALEZ & CARRASCO (1987) mostraram que tanto a heparina, quanto a iota-carragenana, que são polissacarídeos sulfatados, podem ser internalizados juntamente com o vírus, resultando em inibição da replicação viral, sugerindo que polissacarídeos sulfatados também podem inibir a replicação viral, não agindo somente durante a adsorção. Iota-carragenana na concentração de 10 µg/mL reduziu o título de HSV -1 em 100.000 vezes. Este polissacarídeo sulfatado foi internalizado juntamente com a partícula viral, inibindo a síntese protéica viral e permitindo que o metabolismo celular se mantenha. Este resultado não se reproduziu ao adicionar o polissacarídeo 60 minutos após a inoculação viral (GONZALEZ, 1987).

A maioria dos polissacarídeos com atividade antiviral são naturalmente sulfatados, extraídos de algas marinhas, como *Schizymenia pacifica* (NAKASHIMA *et al.* 1987), *Nothogenia fastigiata* (DAMONTE *et al.*, 1996), *Cryptonemia crenulata* (TALARICO *et al.*, 2005), *Porphyridium* sp. (TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002).

Com atividade anti-herpética, xilogalactanas isoladas de *Nothogenia fastigiata* inibiram a replicação de HSV-1 em 50%, nas concentrações entre 15,0 - 32,6 µg/mL

(DAMONTE *et al.*, 1996), e kapa/iota/nu carragenana com 0,5 – 5,6 µg/mL (TALARICO, *et al.*, 2005). A formação de sarcoma, induzida pela infecção do vírus do sarcoma murino, assim como a replicação do vírus da leucemia murina foram inibidos por polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Porphyridium* sp. (TALYSHINSKI, SOUPRUN, HULEINEL, 2002)

AMOMRUT *et al.*, (1999) extraíram polissacarídeos sulfatados a partir do molusco marinho, *Meretrix petechialis*, mostrando a redução de 50% da replicação do HIV - 1 com 200 µg/mL do polissacarídeo.

Os mesmos polissacarídeos sulfatados avaliados no presente trabalho apresentaram atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da dengue tipo 1 (DEN-1) e febre amarela selvagem (YFV) (ONO *et al.*, 2003) *in vitro* (ONO, 2004). Nesses experimentos, a galactomanana sulfatada de bracinga (BS) e galactomanana sulfatada de leucena (LS), reduziram o título do vírus da dengue tipo 1 e febre amarela selvagem (YFV) em 100 vezes, nas respectivas concentrações inibitórias, BS (347 µg/mL e 1055 µg/mL) e LS (37 µg/mL e 386 µg/mL). A atividade destes polissacarídeos *in vivo* foi analisada em camundongos, com LS apresentando 96,5% de proteção, e BS 87,8%. Ambos polissacarídeos não apresentaram efeito tóxico letal em concentração inferior a 5 mg/mL. Concluindo que galactomananas sulfatadas inibiram a atividade *in vitro* e *in vivo* dos flavivírus testados.

Galactomananas sulfatadas de *Cassia fastuosa* inibiram o aparecimento de efeito citopático (avaliada por u.f.p) contra o HSV-1 na concentração de 71 µg/mL, observado com 48 horas de incubação (ONO, 2004).

TISCHER *et al.* (2006) analisaram a atividade antiviral de carragenanas a partir da alga vermelha *Meristiella gelidium*, contra HSV-2, e vírus da dengue tipo 2 (DEN-2). O grau de sulfatação dos polissacarídeos testados variou entre 33 e 11%. A concentração inibitória encontrada para HSV-2 foi entre 0,04 – 0,06 µg/mL, e DEN-2 entre 0,14 – 1,6 µg/mL.

Os polissacarídeos sulfatados produzidos pela cianobactéria *Aphanothece halophytica*, inibiram *in vitro* a adsorção viral, a proliferação de células linfóides e interleucinas I e II, potencializando a imunidade celular (ZHENG *et al.*, 2006). Embora Zheng *et al.* (2006) não tenham observado atividade antiviral significativa *in*

vitro, a mesma pôde ser observada *in vivo*, através da ativação de células do sistema imune, reduzindo a infectividade viral. Alguns polissacarídeos podem atuar como imunomoduladores como as glucomananas conhecidas por estimularem macrófagos, células matadoras naturais, e induzirem IL-2, impediram a morte de camundongos infectados com o vírus Punta Toro (PTV). Esses dados sugerem que apesar de não haver ação antiviral direta, estes polissacarídeos estariam exercendo a atividade antiviral através da ativação de macrófagos (SIDWELL *et al.*, 1994; ONO *et al.*, 2003).

Rotavírus são vírus que não apresentam envelope em sua estrutura (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOK, 2001), portanto a ligação entre a partícula viral e a membrana da célula hospedeira, até onde se tem conhecimento, não se dá por moléculas sulfatadas, fato que ocorre entre vírus envelopados e célula hospedeira. No entanto, o relato de GONZALEZ & CARRASCO (1987) abriram a possibilidade de internalização do polissacarídeo sulfatado para o citoplasma da célula hospedeira, interferindo na síntese protéica viral, atuando portanto como antiviral.

Atualmente análogos de nucleosídeos estão sendo testados quanto a atividade antiviral contra rotavirus, como pyranonucleosídeo exometileno insaturado tendo como controle, tratamento com AZT. Os trabalhos relatam que a concentração destes compostos devem ser significativamente altas a fim de obter a mesma resposta antiviral que o AZT, sendo atualmente a linha de pesquisa antirrotaviral mais publicada (AGELIS *et al.*, 2007; MANTA *et al.*, 2007; TSOUKALA *et al.*, 2007).

Extratos de plantas (cascas, sementes, folhas e raízes) foram testadas avaliando suas propriedades antirotaviral. Extratos da raiz de *Lomatium dissectum* (Umbelliferae) inibiu completamente o ECP característico de RV em cultivo celular (MCCUTCHEON *et al.*, 1995). Polissacarídeos aniônicos do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (fam. chrysanthemum), inibiu a replicação *in vitro* de RV humano, provavelmente interferindo da ligação entre VP7 e receptores de membrana da célula hospedeira (TAKAHASHI *et al.*, 2001). Teoricamente íons aniônicos, podem se ligar a VP7 sendo assim, estruturas chave na inibição da adsorção viral (HEROLD *et al.*, 1995).

Extratos de plantas utilizadas popularmente para combater a diarreia mostraram eficiente atividade antiviral contra RV símio. Cascas de *Artocarpus integrifolia* (jaqueira), e folhas de *Anacardium occidentale* (cajueiro), *Psidium guajara* (goiabeira) e *Spondias lútea* (cajazeiro) inibiram a replicação *in vitro* do RV símio SA-11 em mais de 80% (GONÇALVES *et al.*, 2005).

Não encontramos na literatura a utilização de extratos polissacarídicos de sementes ou folhas de leguminosas contra rotavírus.

Até o momento não há relatos na literatura de atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados contra rotavírus, assim, um futuro estudo de interação das proteínas virais, VP4 e VP7 e essas moléculas poderá fornecer dados sobre o mecanismo de ação antiviral da galactomanana sulfatada da bracinga, assim como, marcadores moleculares poderão informar a possibilidade de internalização do polissacarídeo juntamente com partículas virais para o interior da célula hospedeira.

Novos trabalhos poderão ser realizados com polissacarídeos sulfatados e RV em experimentos *in vivo*, avaliando a atividade destas moléculas no sistema imune, e trato gastrointestinal, uma vez que rotavírus têm enterócitos (células do epitélio intestinal) como células hospedeiras.

5. Conclusões

Com a análise de citotoxicidade foi observado que em células MA₁₀₄ a galactomanana sulfatada de leucena apresentou toxicidade na concentração aproximada de 255 µg/mL, reduzindo em 50% a viabilidade celular em cultivo *in vitro*. A galactomanana sulfatada de bracinga apresentou citotoxicidade com a maior concentração testada, 625 µg/mL, reduzindo em ~ 24 % a viabilidade das células testadas.

Com a avaliação da citotoxicidade das galactomananas nativas, os dados mostraram que não há citotoxicidade em células MA₁₀₄, e, além disso, células expostas a galactomanana nativa de leucena parecem ter sua multiplicação estimulada, porém esta resposta deverá ser melhor estudada.

Devido ao fato de não haver informações na literatura sobre a resposta da linhagem celular MA₁₀₄ em exposição à galactomananas sulfatadas, existe a possibilidade de que a linhagem celular estudada seja mais suscetível aos polissacarídeos sulfatados em relação às linhagens relatadas nos demais trabalhos, como VERO e C6/36.

Os dados do teste de citotoxicidade de leucena nativa mostraram um aumento no número de células viáveis na presença deste polissacarídeo em relação ao controle, com este dado, sugere-se que sejam realizados futuramente estudos a fim de conclusões definitivas a respeito desta característica ainda não avaliada em nenhum trabalho.

No teste da atividade antiviral de polissacarídeos nativos e sulfatados de leucena e bracinga, foi observado que a galactomanana sulfatada de leucena e as galactomananas nativas de leucena e bracinga não tiveram resposta de inibição da replicação viral. No entanto, foi observado que a galactomanana sulfatada de bracinga reduziu em aproximadamente 10% o efeito citopático provocado pelo rotavírus SA-11 em concentrações superiores a 1,2 µg/mL.

O mecanismo pelo qual o polissacarídeo sulfatado apresentou atividade antiviral, reduzindo o efeito citopático, é ainda desconhecido, havendo muitos alvos, como a inibição da adsorção viral, ou a penetração do polissacarídeo juntamente com as partículas virais inibindo a replicação viral, ou a ligação entre polissacarídeo e superfície celular, ou ainda a possibilidade de interferência com o transporte de cálcio, reduzindo a replicação viral.

A resposta positiva da galactomanana sulfatada de bracatinga para atividade antiviral juntamente com seu baixo potencial citotóxico possibilita estudos mais detalhados dessa atividade, explorando também a pesquisa *in vivo*.

6. Referências Bibliográficas

ANGELI, A. Mimosa scabrella (bracatinga). **Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP**, [atualizado em 14 de novembro de 2003], 2003.

AGELIS, G.; TZIOUMAKI, N.; BOTIC, T.; CENCIC, A.; KOMIOTIS, D. Exomethylene pyranonucleosides: Efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene- β -D-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 5448–5456, 2007.

AGELIS, G.; TZIOUMAKI, N.; TSELIOS, T.; BOTIC, T.; CENCIC, A.; KOMIOTIS, D. Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1366 – 1375, 2008.

ANDERSON, E. J.; WEBER, S. G.; Rotavirus infection in adults. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 4, 2004.

ANDERSON, E. J. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. **Lancet Infect Dis.**, v. 8, p. 642 – 649, 2008.

ARIAS, C. F.; DECTOR, A. M.; SEGOVIA, L.; LÓPEZ, T.; CAMACHO, M.; ISA, P.; ESPINOSA, R.; LÓPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Research**, v. 102, p. 43 – 51, 2004.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E. Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32 (11), p. 1742 – 1745, 1988.

BABIUK, L. A.; MOHAMMED, K.; SPENCE, L.; FAUVEL, M.; PETRO, R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 610 – 617, 1977.

BARMAN, P.; GHOSH, S.; SAMAJDAR, S.; MITRA, U.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHINAN, T.; KOBAYASHY, N.; NAIK, T.N. RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhea. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, p. 222 – 227, 2006.

BINES, J. Intussusception and rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, p. 3772–3776, 2006.

BEDOYA, L. M.; SANCHEZ – PALOMINO, S.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 113 – 116, 2001.

BERECIARTU, A.; BOK, K.; GÓMEZ, J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, p. 197–203, 2002.

BOLTON, S.; DEKKER, M. *Pharmaceutical Statistics—Practical and Clinical Applications*. New York, p. 645, 1990.

BONHOEFFER, J.; HEATH, P. T.; Update on new vaccines and immunisation strategies. **Current Paediatrics**, v. 16, p. 1 - 7, 2006.

BOSHWIZEN, J. A.; REIMERINK, H. J.; MALE, A. M. K.; HAM, V. J. J.; BOUMA, J.; GERWIG, G. J.; COOPMANS, M. P. G.; BÜLLER, H. A.; DEKKER, J.; EINERHAND, A. W. C. Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. **Virology**, v. 337, p. 210 – 221, 2005.

BURKART, A. Leguminosas - Mimosoideas. In *Flora ilustrada catarinense* (R. Reitz, ed.). **Herbário Barbosa Rodrigues**, Itajaí, p.1-299, 1979.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, p. 97 – 105, 1997.

CASTILHO, 2004

CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C. G.; MANDAL, D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1428–1435, 2007.

CHOI, N.; ESTES, K. M.; LANGRIDGE, R.H.W. Oral immunization with a shiga toxin B subunit::rotavirus NSP4₉₀ fusion protein protects mice against gastroenteritis. *Vaccine*, v. 23, p. 5168–5176, 2005.

CLARK, K. J.; GRANT, P. G.; SARR, A. B.; BELAKERE, J. R.; SWAGGERTY, C. L.; PHILLIPS, T. D.; WOODE, G. N. An in vitro study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 147 – 157, 1998.

CLARCK, H.F.; OFFIT, P.A. Vaccines for gastroenteritis universally needed for infants. **Pediatric Annals**, v. 33 (8), p. 536-543, 2004.

COELHO, I K.; BRYDEN, S. A.; HALL, C.; FLEWET H. T. Pathology of rotavirus infection in suckling mice: A study by conventional histology, immunofluorescence, ultrathin sections, and scanning electron microscopy. **Ultrastruct Pathology**, p. 59 – 80, 1981.

COHEN, J. Medicine: rethinking a vaccine's risk. **Science**, v. 31, 2001

CONDIT.Virus: KNIPE.; HOWLEY. **Fields virology**, 4 ed. Philadelphia, p. 393-433, 2001.

COOPER, E. L.; Commentary on *Traditional and Modern Biomedical*

Prospecting: Part II—The Benefits by Werner E.G. Müller, Heinz C. Schröder, Matthias Wiens, Sanja Perovic-Ottstadt, Renato Batel and Isabel M. Müller. **eCAM**, v. 1(2), p. 207 – 209, [Oxford University Press], 2004.

CRUMPACKER, C. Antiviral therapy: KNIPE.; HOWLEY. **Fields virology**, 4 ed. Philadelphia, p. 393-433, 2001.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S.; COTO, C.E. Herpes simplex virus-inibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemother**, v. 42, p. 57-64, 1996.

DEIG, E. F.; EHRESMANN, D. W.; HATCH, M.T.; RIEDLINGER, D. J. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v 6 (4), p. 524-525, 1974.

DELMAS, O.; GARDET, A.; CHWEZOFF, S.; BRETON, M.; COHEN, J.; SAPIN, C.; TRUGNAN, G. Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft – dependent, Golgi – independent apical targeting pathway. **Virology**, 2004.

DESSELBERGER, U.; GRAY, J.; Viral gastroenteritis. The Medicine Publishing Company Ltd, 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, v. 89, p. 271–277, 1986.

DISTEFANO, D. J.; GOULD, S. L.; MUNSHI, S.; ROBINSON, D. K. Titration of human-bovine rotavirus reassortants using a tetrazolium-based calorimetric end-point dilution assay. **Journal of Virological Methods**, v 55. p. 199-208, 1995.

DOMINGUES, A. L. S.; MORAIS, A. T. S.; CRUZ, R. L.; MOREIRA, L. P.; GOUVÊA, V. S. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, p. 298 – 301, 2008.

DUNCAN, J.D.; WANG, P.X.; HARRINGTON, C.M.; SCHAFER, D.P.; MATSUOKA, Y.; MESTECKY, J.F.; COMPANS, R.W.; NOVAK, M.J. Comparative analysis of oral delivery systems for live rotavirus vaccines. **Journal of Controlled Release**, v. 41, p. 237-247, 1996.

EMPRAPA, Leucena (*Leucaenaspp.*), <http://www.cnpqc.emprapa.br/publicacoes/ct/ct13/03leucena.html> [acesso em outubro de 2008].

ESPÍNOLA, E. E.; PARRA, G. I.; RUSSOMANDO, G.; ARBIZA, J. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: Analysis of Paraguayan strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 94–99, 2008.

ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; GARBA, C. P.; SMITH, E.M. Simian Rotavirus SAI Replication in Cell Cultures. **Journal of virology**, v. 31 (3), p. 810 – 815, 1979.

ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; MASON, B. B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. **Journal of virology**, v. 39, p. 879 – 888, 1981.

ESTES, M. K.; Rotaviruses and their replication: KNIPE.; HOWLEY. **Fields virology**, 4 ed. Philadelphia, p. 393-433, 2001.

FERNANDES, C.A.D.; NAKASHIMA, T.; SERRA G.E.; Novas contribuições ao estudo de galactomanana bruta extraída de Sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, 2004.

FERREIRA, C. A. G.; TAUKE – TORNISIELO, S. M.; CHAVES, M. M. F. Comportamento de bracinga (*Mimosa scabrella*) e sesbânia (*Sesbania sesban*) em áreas degradadas pela disposição de resíduos provenientes do processamento da bauxita. *Holos Environment*, v. 2 (2), p. 156 – 173, 2002.

FLEXNER, C.; BARDITCH – CROVO, P. A.; KORNHAUSER, D. M.; FARZADEGAN, H.; NERHOOD, L. J.; CHAISSON, R. E.; BELL, K. M.; LORENTSEN, K. J.; HENDRIX, C. W.; PETTY, B. G.; LIETMAN, P. S. Pharmacokinetics, toxicity and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 35, p. 2544 – 2550, 1991.

FRANCO, M. A.; GREENBERG, H. B. Immunity to homologous rotavirus infection in adult mice. **Trends in Microbiology**, v. 8 (2), p. 50 – 52, 2000.

FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, p. 2718 – 2731, 2006.

FROMANTIN, C.; PIROTH, L.; PETITPAS, I.; POTHIER, P.; KOHLI, E. Oral Delivery of Homologous and Heterologous Strains of Rotavirus to BALB/c Mice Induces the Same Profile of Cytokine Production by Spleen Cells. **Virology**, v. 244, p. 252 – 260, 1998.

GLASS, R.I.; BRESEE, J.S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.; JIANG, B.; WIDDOWSON, M.A.; GENTSCH, J. Rotavirus vaccines: past, present, and future. **Archives de Pédiatrie**, v. 12, p. 844-847, 2005.

GÓES, A. C. M. de.; MORAES, M. T. B. de.; SILVEIRA, W. de C.; ARAÚJO, I. T.; H'ALLIUN, J-C. de.; SOUZA, W. da S.; SILVA JUNIOR, J. G. da.; LEITE, J. P. G. Development of a rapid and sensitive latex agglutination-based method for detection of group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 148, p. 211–217, 2008.

GOMARA, M.I., CUBITT, D., DESSELBERGER, U., GRAY, J. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. **Journal of Clinical Microbiology**. 39, 3796–3798, 2001

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 403–407, 2005.

GONZÁLEZ, M.E.; CARRASCO, L. Animal viruses promote the entry of polysaccharides with antiviral activity into cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 146 (3), p. 1303-1310, 1987.

GONZÁLEZ, M. E.; ALARCÓN, B.; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31 (9), p. 1388 – 1393, 1987.

GUIMARÃES, M. A. A. M.; NOZAWA, C. M.; GUIMARÃES, A. C. C.; RAMOS, S. Rotavirus and reovirus interaction with mouse peritoneal resident phagocytic cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1187 – 1190, 1997.

GUTIÉRREZ – AGUIRRE, I.; BANJAC, M.; STEYER, A.; POLJSAK – PRIJATELJ, M.; PETERK, M.; STRANCAR, A.; RAVNIKAE, M. Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports. **Journal of chromatography**, A, p. 349 – 424, 2008.

HERNÁNDEZ-CORONA, A.; NIEVES, I.; MECKES, M.; CHAMORRO, G.; BARRON, B. L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v. 56, p. 279 – 285, 2002.

HEROLD, B.C. GERBER, S.I.; POLONSKY, T.; BELVAL, B.J.; SHAKLEE, P.N.; HOLME, K. Identification of structural features of heparin required for inhibition of Herpes Simplex virus type 1 binding. **Virology**, v. 206, p. 1108 – 1116, 1995.

IJAZ, M. K.; NUR-E-KAMAL, M. S. A.; DAR, F. K.; UDUMAN, S.; REDMOND, M. J.; ATTAH-POKU, S. K.; DENT, D.; BABIUK, L. A. Inhibition of rotavirus infection *in vitro* and *in vivo* by a synthetic peptide from VP4. **Vaccine**, v. 16 (900), p. 916-920, 1996.

JACOBSON, R. M.; ADEGBENRO, A.; PANKRATZ, A. S.; POLAND, G. A. Adverse events and vaccination-the lack of power and predictability of infrequent events in pre-licensure study. **Vaccine**, v. 19, p. 2428 – 2433, 2001.

JAYARAM, H.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v. 101, p. 67–81, 2004.

JEREZ, A. A.; BRANDÃO, E. E.; BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Detecção de rotavirus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, **Brasil. Arq. Inst. Biol.**, v. 69 (2), p. 19 – 23, 2002.

JESUS, M. de; HACKETT, E.; DURKIN, CONNOLLY, P.; CASADEVALL, A.; PETRAITIENE, R.P.; WALSH, T.J.; WHEATZ, J.L. Galactoxylomannan does not exhibit cross-reactivity in the platelia *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. **Clin. Vac. Immunologi**, v. 14, p. 624 – 627, 2007.

JOHANSSON, E.; ISTRATE, C.; CHARPILLENNE, A.; COHEN, J.; HINKULA, J.; PONCET, D.; SVENSSON, L.; JOHANSEN, K. Amount of maternal rotavirus-specific

antibodies influence the outcome of rotavirus vaccination of newborn mice with virus-like particles. **Vaccine**, v. 26, p. 778 – 785, 2008.

JOTHIHUMAR, N.; KANG, G.; HILL, V. R. Broadly reactive TaqMan® assay for real time RT – PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. **Journal of Virological methods**, v. 155, p. 126 – 131, 2009.

JUNG, K.; KANG, B.; LEE, C.; SONG, D. Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity in piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 502 – 506, 2008.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1787-1833, 2001.

KOLENDER, A. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. The system of sulfated α -(1→3) linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties. **Carbohydrate research**, v. 304 (1), p. 53 – 60, 1997.

KUTSUZAWA, T.; KONNO, T.; SUZUKI, H.; KAPIKIAN, A. Z.; EBINA, T.; ISHIDA, N. Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. **Journal of clinical microbiology**, p. 727 – 730, 1982.

LALITHA, K.; VARGHEESE, C. M.; BALASUBRAMANIAN, N. Spectrophotometric Determination of Mimosine and 3-Hydroxy-4-(1H)-pyridone - The Toxic Principles of *Leucaena leucocephala*. **Analytical Biochemistry**, v. 213 (1), p. 57 – 62, 1993.

LEE, E.; PAVY, M.; YOUNG, N.; FREEMAN, C.; LOBIGS, M. Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 69, p. 31–38, 2006.

LIMA, J. A. de.; EVANGELISTA, A. R. Leucena (*Leucaena leucocephala*) **BRAPA–CNPGC**, p. 52, [EMBRAPA–CNPGC. Circular técnica, 13], 1983.

LIPRANDI, F.; MOROS, Z.; GERDER, M.; LUDERT, R.E.; PUJOL, F.E.; RUIZ, M.C.; MICHELANGELI, F.; CHARPILLENNE, A.; COHEN, J. Productive Penetration of Rotavirus in Cultured Cells Induces Coentry of the Translation Inhibitor α -Sarcin. **Virology**, v. 237, p. 430 – 438, 1997.

LIPSON, S. M.; SETHI, L.; COHEN, P.; GORDON, R. E.; TAN, I. P.; BURDOWSKI, A.; STOTZKY, G. Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 23 – 30, 2007.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública**, v. 16 (3), 629 – 646, Rio de Janeiro, 2000.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of *Rotavirus* diarrhea. **Microbes and Infection**, 3, 1145–1156, 2001.

MACHADO, S. do A.; SILVA, L. C. R. da.; URBANO, E.; FIGURA, M. A.; TÉO, S. J.; STOLLE, L. Modelagem do volume e do peso da casca de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Revista Ambi – Água**, v. 1 (2), p. 39 – 51, 2006.

MANCINI, D.A.P.; MENDONÇA, R.M.Z.; DIAS, A.L.F.; MENDONÇA, R.Z.; PINTO, J.R. Co-infection between influenza virus and flagellated bacteria. **Rev. Int. Med. Trop. S. Paulo**, v.47, 2005.

MANDAL, P.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; CHATTOPADHAY, K.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2193 – 2199, 2008.

MANTA, S.; AGELIS, G.; BOTIC, T.; CENCIC, A.; KOMIOTIS, D. Fluoroketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-b-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 980 – 987, 2007.

MANTA, S.; AGELIS, G.; BOTIC, T.; CENCIC, A.; KOMIOTIS, D. Unsaturated fluoroketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3 fluoro-4-keto-b-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine and N6-benzoyl adenine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 420 – 428, 2008.

MARKOWSKA-DANIEL, I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Immun. Infect. Diseases**, v. 19(3), p. 219-232, 1996.

MASCARENHAS, J, D. P. Caracterização molecular de genótipos de rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003: estudo em neonatos, crianças diarreicas de 0-3 anos e ensaio clínico com vacinas. **Tese, Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2006.

MATUDA, T. G.; NETTO, F. M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ci . Tecnol. Aliment.**, v.25 (2). Campinas, 2005.

MCCUTCHEON, A. R.; ROBERTS, T. E.; GIBBONS, E.; ELLIS, S. M.; BABIUK, L. A.; HANCOCK, R. E. W.; TOWERS, G. H. N. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 101-110, 1995.

MERCÊ, A. L.R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; SZPOGANICZB, B.; Fe(III) - Galactomannan solid and aqueous complexes. potentiometric, EPR spectroscopy and thermal data. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 12, p. 791-798, 2001.

MEHNERT, D.; STEWIEN, K.; HÁRSI, A.; CANDEIAS, J.; CANDEIAS, J. A. Detection of rotavirus in sewage and creek water: Efficiency of the concentration method. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92 (1), P. 97 – 100, 1997.

MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Rotavirus Vaccines: an Overview. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9(3), p. 423–434, 1996.

MUTWIRI, G.; BOWERSOCK, T.; KIDANI, A.; SANCHEZ, M.; GERDTS, V.; BABIUKI, L. A.; GRIEBEL, P. Induction of mucosal immune responses following enteric immunization with antigen delivered in alginate mimicrospheres. **Veretinary immunology and immunopathology**, v. 87, p. 269 – 276, 2002.

NAKASHIMA, H. KIDO, Y.; KOBAYASHIMA, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M.; YAMAMOTO, N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 31 (10), p. 1524-1528, 1987.

NEYTS, J.; REYEMEN, D.; LETOURNEUR, D.; JOZEFONVICZ, J.; SCHOLS, D.; ESTÉ, J.; ANDREI, G.; MCKENNA, P.; WITVROUW, M.; IKEDA, S.; CLEMENT, J. DE CLERQ, E.; Differential antiviral activity of derivatized dextrans. **Biochem. Pharmacol**, v. 50, p. 743–751, 1995.

NING, Y.; LUN – GUANG, Y.; XIANG – MAN, Z.; TAI – LIN, G.; YUN – CHAO, K. Screening for Peptides of Antirotavirus by Phage-displayed Technique. **Chin J Biotech**, v. 23(3), p. 403 – 408, 2007.

O' MAHONY, J.; O' DONOGHUE, M.; MORGAN, J. G.; HILL, C. Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimised plaque assay procedure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 177–185, 2000.

OFFIT, P. A. The rotavirus vaccine. **Journal of Clinical Virology**, v. 11, p. 155 – 159, 1998.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GOIN, P. A. L.; SIERAKOWISKI, M. R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v. 60, p. 201–208, 2003.

ONO, L. Atividade antiviral de galactomananas modificadas por oxidação e/ou sulfatação. **Tese bioquímica, Universidade Federal Paraná**. 2004.

PAREZ, N. Rotavirus gastroenteritis: Why to back up the development of new vaccines? **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31 p. 253–269, 2008.

PATTON, J. T.; VASQUEZ – DEL CARPIO, R.; TORTORICI, M. A.; TARAPOREWALA, Z. F. Coupling of Rotavirus Genome Replication and Capsid Assembly. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 167 – 201, 2006.

PERET, T. C. T.; DURIGON, E. L.; CANDEIAS, J. M. G.; STEWIEN, E.; CANDEIAS, J. A. N. A combined staphylococcal coagglutination assay for rapid identification of rotavirus and adenovirus (COARA). **Journal of Virological Methods**, v. 52, p. 265 – 272, 1995.

PÉREZ – VARGAS, J.; ISA, O.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C. F. Rotavírus Vaccine: Early Introduction in Latin América – Risks and Benefits. **Archives of Medical Research** 37, p. 1 – 10, 2006.

PETERSON, J. A.; YOLKEN, R. H.; NEWBURG, D. S.; Anti – diarrheic product and method of treating rotavirus – associated infection. [**Cancer research Fund of Contra Costa the Johns Hopkins University School of Medicine**], CA, United States, 1998.

PIRON, M.; VENDE, P.; COHEN, J.; PONCET, D. Rotavirus RNA – binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly (A) binding protein from eIF4F. **Microbiol. Immunol.**, v. 25 (10), p. 1025 – 1035, 1998.

PLOTKIN, S. A. Vaccination against the major infectious diseases. *Académie des sciences*, v. 322, p. 943 – 951, 1999.

RAMIA, S.; SATTAR, A. Simian rotavirus SA-11 plaque formation in the presence of trypsin. **Jorn. of clinical microbiology**, v. 10, p. 513-519, 1979.

RAMOS, A. P.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; NOZAWA, C. M. The infectivity of pig rotavirus in stools. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 84 – 87, 1998.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p.493–497, 1938.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA E.; GREGORI, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in MA 104 cells using different trypsin concentrations. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, n.4, p. 437 – 441, 2004.

RODRÍGUEZ, M.C.; MERINON, E. R.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S.; MATULEWICZ, M.C. Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllis variegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales). **Carbohydrate Research**, v. 340 p. 2742–2751, 2005.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in MA 104 cells using different trypsin. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 71, p. 437 – 441, 2004.

SANTOS, J.S. Epidemiologia e caracterização dos genótipos P (VP4) e G (VP7) de Rotavirus humano Grupo A no Estado do Paraná, 2000-2003. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Geral)**, UFPR, 2005.

SESSP – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Vacina contra rotavírus – Informe Técnico Institucional. **Revista de Saúde Pública**, v.40(2), p.355-358, 2006.

SIDWELL, R.; HUFFMAN, J. H.; BARNARD, D. L.; SMEE, D. F.; WARREN, R. P.; CHIRIGOS, M. A.; KENDE, M. A.; HUGGINS, J. Antiviral and immunomodulating

inhibitors of experimentally-induced Punta Toro virus infections. *Antiviral Res.*, v. 25, p. 105–122, 1994.

SMITH, E. M.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; GERBA, C. P. A Plaque Assay for the Simian Rotavirus SA – 11. *J. gen. Virol.*, v. 43, p. 513-519, 1979.

STEFANELLI, C. C.; CASTILHO, G. J.; BOTELHO, G. J.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. M.; Effect of actinomycin D on simian rotavirus (SA11) replication in cell culture. *Braz J Med Biol Res*, v. 35 (4), p. 445-449, 2002.

SUPERTI, F.; SICILIANO, R.; REGA, B.; GIANSAANTI, F.; VALENTI, P.; ANTONONU, G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1528, p. 107 – 115, 2001.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARÍA, P. C. S; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. S.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 63–71, 2004.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARÍA, P. C. S; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*, v. 66, p. 103–110, 2006.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OHASHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTANI, K.; SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Research*, v. 49, p. 15–24, 2001.

TALYSHINSKY, M. M.; SOUPRUN, Y. Y.; HULEINEL, M.M.; Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International*, v. 2, p. 2 -8, 2002.

TIHOVA, M.; DRYDEN, K.A.; BELLAMY, A.R.; GREENBERG, H.B.; YEAGER, M. Localization of Membrane Permeabilization and Receptor Binding Sites on the VP4 Hemagglutinin of Rotavirus: Implications for Cell Entry. *J. Mol. Biology*, v. 314, p. 985-992, 2001.

TISCHER, P. C de S. F.; TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. B.; GUIMARÃES, S. M. P. B.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 459 – 465, 2006

TSOUKALA, E.; AGELIS, G.; DOLINSEK, J.; BOTIC, T.; CENCIC, A.; KONIOTIS, D. An efficient synthesis of 3-fluoro-5-thio-xylofuranosyl nucleosides of thymine, uracil, and 5-fluorouracil as potential antitumor or/and antiviral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 3241–3247, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Sistema de bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007.

VAN DER STRATE, B. W. A.; BELJAARS, L.; MOLEMA, G.; HARMSSEN, M. C.; MEIJER, D. K. F. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, p. 225 – 239, 2001.

VILLEGAS, G.A.; ARGÜLLES, N.H.; CASTELLO, A.A.; MAS, N.J.; GLIKMANN, G. A rapid method to produce high yields of purified rotavirus particles. **Journal of Virological Methods**, v. 104, p.9-19, 2002.

VRANJAC, A. Diarréia e Rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, 38 (6): 844 – 5; São Paulo, 2004.

VRANJAC, A. Vacina contra rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, 40 (2): 355 – 8; São Paulo, 2006.

VENDRUSCOLO, C. W.; Goma xantana e galactomanana (M. scabrella): desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina. **Dissertação, ciênc. Farmac. Universidade do Vale do Itajaí**. 2005.

ZACHAROPOULOS, V. R.; PHILLIPS, D. M. Vaginal Formulations of Carrageenan Protect Mice from Herpes Simplex Virus Infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4 (4), p. 465 – 468, 1997.

ZOMER, T.P.; VAN DUYNHOVEN. Y.T.H.P.; MANGEN, M. J. J.; VAN DER MAAS N. A. T.; VENNEMA, H.; BOOT, H.; DE MELKER, H. E. Assessing the introduction of universal rotavirus vaccination in the Netherlands. **Vaccine**, v. 26, p. 3757 – 376, 2008.

ZHENG, W.; CHEN, C.; CHENG, Q.; WANG, Y.; CHU, C. Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1093–1099, 2006.

YONN, S – J.; CHU, D – C.; JUNEJA, L. R. Chemical and physical properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 42, p. 1–7, 2008.

Endereços eletrônicos utilizados:

http://www.rarexoticseeds.com/Trees_Palms_Shrubs/Graines_Mimosa_Scabrella_Seeds_Mimosa_Bracatinga (último acesso em janeiro de 2009).

http://coralx.ufsm.br/herbarioflorestal/img/especies/leucena_extra.jpg (último acesso em janeiro de 2009).

http://www.liv.ac.uk/vets_med_images/mmgum/rotavirus.jpg (último acesso em fevereiro de 2009).

